

DOI:10.16781/j.0258-879x.2019.09.0945

· 论 著 ·

雷奈酸锶改善成骨不全症模型 *oim* 小鼠代谢失衡的双向机制

孙斌¹, 徐增¹, 吴卉乔¹, 郭蕾², 张颖¹, 石长贵^{1*}, 袁文¹

1. 海军军医大学(第二军医大学)长征医院脊柱外科, 上海 200003

2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院上海市伤骨科研究所, 上海市中西医结合防治骨与关节病损重点实验室, 上海 200025

[摘要] **目的** 探讨雷奈酸锶对成骨不全症(OI)模型 *oim* 小鼠成骨细胞和破骨细胞的双重作用。**方法** 取1周龄OI模型纯合子 *oim/oim* 小鼠及野生型(wt/wt)小鼠的颅骨, 采用I型胶原酶通过连续消化法获取成骨细胞; 取5~7周龄 *oim/oim* 小鼠和 wt/wt 小鼠的长骨, 获取骨髓单核细胞诱导分化成破骨细胞。给予不同浓度(1、10 mmol/L)的雷奈酸锶进行干预, 采用实时定量PCR(qRT-PCR)及蛋白质印迹法分别在mRNA及蛋白水平检测成骨细胞分化相关基因Runx相关转录因子2(*Runx2*)、碱性磷酸酶(*ALP*)、骨钙蛋白(*OCN*), 破骨细胞分化相关基因降钙素受体(*Calcr*)、抗酒石酸磷酸酶(*Trap*)、组织蛋白酶K(*CTSK*), 以及破骨分化相关转录因子c-fos、活化T细胞核因子c1(NFATc1)的表达; 采用ALP染色及茜素红S染色观察成骨分化及矿化情况; 采用Trap染色及骨片陷窝实验评估破骨细胞形成数量及骨吸收活性; 采用3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)比色法检测雷奈酸锶对成骨细胞和破骨细胞活性的影响。**结果** qRT-PCR及蛋白质印迹法检测结果显示, 雷奈酸锶在mRNA及蛋白水平均可促进 *oim/oim* 小鼠成骨细胞分化相关基因(*Runx2*、*ALP*、*OCN*)的表达增加, 同时抑制破骨细胞分化相关基因及转录因子(*Calcr*、*Trap*、*CTSK*、c-fos、NFATc1)的表达(P 均 <0.05), 且随浓度增加作用增强。ALP染色及茜素红S染色结果显示, 雷奈酸锶可促进 *oim/oim* 小鼠成骨细胞分化及矿化(P 均 <0.05)。Trap染色及骨片陷窝实验结果显示, 雷奈酸锶可降低 *oim/oim* 小鼠破骨细胞形成数量和破骨细胞骨吸收活性(P 均 <0.05)。MTT结果显示, 1 mmol/L、10 mmol/L 雷奈酸锶对 *oim/oim* 小鼠成骨细胞和破骨细胞无细胞毒性。**结论** 雷奈酸锶可有效改善OI模型 *oim* 小鼠的骨代谢失衡, 其机制可能是促进成骨细胞分化及矿化, 同时抑制破骨细胞的形成及骨吸收活性。

[关键词] 雷奈酸锶; 成骨不全症; 成骨细胞; 破骨细胞; 代谢

[中图分类号] R 681.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)09-0945-09

Strontium ranelate improving metabolic imbalance in *oim* mice of osteogenesis imperfecta: the dual mechanism

SUN Bin¹, XU Zeng¹, WU Hui-qiao¹, GUO Lei², ZHANG Ying¹, SHI Chang-gui^{1*}, YUAN Wen¹

1. Department of Spine Surgery, Changzheng Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200003, China

2. Shanghai Key Laboratory for Prevention and Treatment of Bone and Joint Diseases, Shanghai Institute of Traumatology and Orthopaedics, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective** To explore the dual effects of strontium ranelate (SrR) on primary osteoblasts and osteoclasts using an osteogenesis imperfecta (OI) model *oim* mouse. **Methods** The osteoblasts were obtained by digesting the calvaria of one-week-old homozygote *oim/oim* mice and wild type (wt/wt) mice with type I collagenase. The osteoclasts were obtained by inducing the bone marrow mononuclear cells derived from the long bone of *oim/oim* mice and wt/wt mice aged between five and seven weeks old. SrR with different concentrations (1 mmol/L and 10 mmol/L) was used to stimulate the cells. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blotting were used to quantify the expression of osteoblast differentiation-related genes (Runx-related transcription factor 2 [*Runx2*], alkaline phosphatase [*ALP*] and osteocalcin [*OCN*]), osteoclast differentiation-related genes (calcitonin receptor [*Calcr*], tartrate-resistant acid phosphatase [*Trap*] and cathepsin K [*CTSK*]), and osteoclast differentiation-related transcription factors (cellular oncogene fos [c-fos] and nuclear factor of activated T-cell c1 [NFATc1]). The osteoblast differentiation and mineralization were evaluated by ALP staining and alizarin

[收稿日期] 2019-04-26 **[接受日期]** 2019-06-05

[基金项目] 国家自然科学基金(81802120), 上海市科学技术委员会科研计划项目(18YF1423100). Supported by National Natural Science Foundation of China (81802120) and Science Research Project of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (18YF1423100).

[作者简介] 孙斌, 硕士生, 住院医师. E-mail: sunbinspine@smmu.edu.cn

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885651, E-mail: charlieshi@smmu.edu.cn

red S staining. The osteoclastogenesis and resorption activity of the osteoclasts were evaluated by Trap staining and pit formation assay. The effect of SrR on cell viability of osteoblasts and osteoclasts was evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. **Results** qRT-PCR and Western blotting showed that the expression levels of Runx2, ALP, and OCN in *oim/oim* mice were significantly increased at mRNA and protein levels after stimulation with SrR in a dose-dependent manner (all $P < 0.05$). In comparison, SrR caused significant decreases in Calcr, Trap, CTSK, c-fos, and NFATc1 expression (all $P < 0.05$). ALP staining and alizarin red S staining demonstrated that SrR stimulation significantly increased osteoblast differentiation and mineralization of *oim/oim* mice (all $P < 0.05$). Trap staining and pit formation assay showed that SrR significantly decreased the formation number of osteoclasts and inhibited the resorption activity of osteoclasts in *oim/oim* mice (all $P < 0.05$). MTT assay showed that 1 mmol/L and 10 mmol/L SrR had no cell cytotoxicity on osteoblasts or osteoclasts of *oim/oim* mice. **Conclusion** SrR can improve the imbalance of bone metabolism in OI model *oim* mouse, which might involve the increases in osteoblast differentiation and mineralization and decreases in formation and resorption of the osteoclasts.

[Key words] strontium ranelate; osteogenesis imperfecta; osteoblasts; osteoclasts; metabolism

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(9): 945-953]

成骨不全症 (osteogenesis imperfecta, OI) 是一组以骨脆性增加、胶原代谢紊乱为特征的全身性遗传性结缔组织疾病, 其发病率为 1/20 000 ~ 1/15 000^[1]。绝大多数 OI 由 I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链 (collagen type I $\alpha 1$ chain, *Colla1*) 或 I 型胶原蛋白 $\alpha 2$ 链 (collagen type I $\alpha 2$ chain, *Colla2*) 基因显性遗传突变使 I 型胶原合成减少或结构异常导致^[2]。OI 根据表型主要分为 5 个亚型 (I ~ V 型), 其临床特征主要包括骨量降低、反复骨折、长骨或脊柱畸形、牙本质发育不全、关节松弛、身材矮小、巩膜蓝色, 甚至死亡等^[3]。OI 症状多于儿童时期开始出现^[4], 严重影响患者的生活质量, 也给家庭和社会带来沉重的负担。

目前, OI 尚缺乏有效的治疗手段, 临床治疗方案主要包括手术矫形、药物治疗、分子与细胞治疗^[5]。药物治疗是 OI 的主要治疗方式, 其中双膦酸盐的临床应用最为广泛。双膦酸盐的治疗作用主要包括增加骨量、减少骨痛、增强肌力及改善生活质量, 然而, 其是否能降低 OI 患者的骨折发生率目前尚无定论^[6-7], 然而研究也发现双膦酸盐具有破坏骨愈合和骨重建、损坏骨细胞、减少骨矿化及抑制骨生长等不良反应^[8-10]。此外, 双膦酸盐半衰期长, 在体内存留时间可达数年, 其治疗 OI 的最佳剂量和疗程仍不清楚。因此, 有必要探索更有效的 OI 治疗药物。

雷奈酸锶 (strontium ranelate, SrR) 是一种新型的治疗骨质疏松药物^[11], 临床试验结果表明 SrR 可增加绝经后妇女脊柱及髋部骨密度、降低脊柱及非脊柱部位的骨折发生率, 而且其疗效可长达 10 年^[12-13]。*oim* 小鼠 (*B6C3Fe- α/α -*

Colla2^{*oim/+*}) 是 *Colla2* 上一处自发突变导致的骨结构异常模型, 与人类 OI 有相同的临床表现和生物学特性, 是目前研究 OI 的主要动物模型^[14]。SrR 可降低 OI 模型 *oim* 小鼠的骨折发生率、增强骨骼力学强度、改善骨微结构^[15]。为进一步揭示 SrR 治疗 OI 的机制, 本研究以 *oim* 小鼠为研究对象, 通过体外细胞学研究探讨 SrR 对 *oim* 小鼠成骨细胞及破骨细胞的影响, 为 SrR 应用于临床治疗 OI 奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物 所有动物操作经海军军医大学 (第二军医大学) 实验动物伦理委员会审核批准, *B6C3Fe- α/α -Colla2*^{*oim/+*} 杂合子购自美国 Jackson 实验室, 委托南京大学-南京生物医药研究院繁育、保种。该品系小鼠后代经基因鉴定、筛选, 获得足够数量的纯合子 (*oim/oim*) 小鼠及野生型 (*wt/wt*) 小鼠。

1.2 成骨细胞的获取与分组 取 1 周龄的 *oim/oim* 或 *wt/wt* 小鼠颅骨, 剪碎后采用 I 型胶原酶 (美国 Sigma 公司) 通过连续消化法 (具体方法参考文献 [16]) 获取成骨细胞, 用含 10% 胎牛血清 (美国 Gibco 公司) 及 1% 青/链霉素 (美国 Gibco 公司) 的 α -MEM 培养液 (美国 Gibco 公司) 培养, 培养条件为 37 °C、5% CO₂、饱和湿度, 待细胞生长至 80% 融合度时进行传代。取第 3 代细胞铺于 6 孔板 (1 × 10⁵/孔), 培养 24 h 后在培养液中添加成骨分化诱导剂: 50 μ g/mL L-抗坏血酸 (美国 Sigma 公司)、10 mmol/L β -甘油磷脂 (美国 Sigma 公司) 及 100 nmol/L 地塞米松 (加拿大 BBI

Life Sciences 公司)。成骨细胞诱导分化时间为 7 d, 每 2 d 更换 1 次培养液。*oim/oim* 干预组成骨细胞在诱导液中加入不同浓度 (1、10 mmol/L) 的 SrR (法国施维雅药厂) 进行干预, 以 *oim/oim* 非干预组及 wt/wt 组成骨细胞作为对照。

1.3 破骨细胞的获取与分组 分离 5~7 周龄 *oim/oim* 小鼠和 wt/wt 小鼠的股骨及胫骨, 获取骨髓, 在含 10% 胎牛血清及 1% 青/链霉素的 α -MEM 培养液中培养, 24 h 后收集未贴壁细胞, 采用 Ficoll 梯度离心法获取骨髓单核细胞 (bone marrow mononuclear cell, BMMC), 用完全培养液重悬后铺于 24 孔板 (2.5×10^4 /孔), 并添加 50 ng/mL 的巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage-colony stimulating factor, M-CSF; 美国 PeproTech 公司); 培养 3 d 后将培养液更换为含 20 ng/mL M-CSF 及 60 ng/mL 核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor κ B ligand, RANKL; 美国 PeproTech 公司) 的 α -MEM 培养液, 其中 *oim/oim* 干预组成骨细胞予以不同浓度 (1、10 mmol/L) 的 SrR 进行干预, 以 *oim/oim* 非干预组及 wt/wt 组成骨细胞作为对照。

1.4 反转录及实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测 mRNA 表达水平 成骨细胞及破骨细胞干预 7 d 后均依次采用 TRIzol (美国 Invitrogen 公司)、氯仿、异丙醇、70% 乙醇进行 RNA 提取 (具体方法参考文献 [16])。RNA 浓度测定后进一步采用反转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司) 反转录为 cDNA; 使用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司), 应用 7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司) 检测成骨细胞分化相关基因 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, *Runx2*)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, *ALP*)、骨钙蛋白 (osteocalcin, *OCN*)、破骨细胞分化相关基因降钙素受体 (calcitonin receptor, *Calcr*)、抗酒石酸磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, *Trap*)、组织蛋白酶 K (cathepsin K, *CTSK*), 以及破骨细胞分化相关转录因子 *c-fos*、活化 T 细胞核因子 c1 (nuclear factor of activated T-cell c1, *NFATc1*) 的 mRNA 表达, 以 *GAPDH* 作为内参照, 各基因扩增引物见表 1。

1.5 蛋白质印迹法检测蛋白表达水平 成骨细胞及破骨细胞干预 7 d 后采用 RIPA 裂解, BCA 法测定蛋白浓度, 高温变性, 依次进行电泳、转膜、封闭 (5% 脱脂奶粉溶液封闭 2 h); 4 °C 条件下

一抗孵育过夜, 相关一抗为 Runx2 (英国 Abcam 公司, 稀释比例为 1:500)、ALP (英国 Abcam 公司, 1:400)、OCN (英国 Abcam 公司, 1:200)、Calcr (英国 Abcam 公司, 1:500)、Trap (英国 Abcam 公司, 1:200)、CTSK (英国 Abcam 公司, 1:400)、*c-fos* (英国 Abcam 公司, 1:1000)、NFATc1 (英国 Abcam 公司, 1:500) 和 β -肌动蛋白 (β -actin; 美国 Santa Cruz 公司, 1:1000)。次日, 用 Tris 盐酸盐缓冲液 + Tween (TBST) 清洗后, 二抗室温下孵育 1 h。用电化学发光法显影成像, 采用 BandScan 软件分析相对蛋白表达水平。

表 1 实时定量 PCR 分析的目标引物序列

Tab 1 Primer sequences for quantitative real-time PCR

Gene	Primer sequence (5' -3')
<i>GAPDH</i>	Forward: AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG Reverse: TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA
<i>Runx2</i>	Forward: ATG CTT CAT TCG CCT CAC AAA Reverse: GCA CTC ACT GAC TCG GTT GG
<i>ALP</i>	Forward: CCA ACT CTT TTG TGC CAG AGA Reverse: GGC TAC ATT GGT GTT GAG CTT TT
<i>OCN</i>	Forward: CTG ACC TCA CAG ATC CCA AGC Reverse: TGG TCT GAT AGC TCG TCA CAA G
<i>Calcr</i>	Forward: GCA ACG CTT TCA CTT CTG AGA Reverse: GTT CCC ACT GCA TTG TCC ACA
<i>Trap</i>	Forward: CAC TCC CAC CCT GAG ATT TGT Reverse: CAT CGT CTG CAC GGT TCT G
<i>CTSK</i>	Forward: GAA GAA GAC TCA CCA GAA GCA G Reverse: TCC AGG TTA TGG GCA GAG ATT
<i>c-fos</i>	Forward: CGG GTT TCA ACG CCG ACT A Reverse: TTG GCA CTA GAG ACG GAC AGA
<i>NFATc1</i>	Forward: GAC CCG GAG TTC GAC TTC G Reverse: TGA CAC TAG GGG ACA CAT AAC TG

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Runx2: Runt-related transcription factor 2; ALP: Alkaline phosphatase; OCN: Osteocalcin; Calcr: Calcitonin receptor; Trap: Tartrate-resistant acid phosphatase; CTSK: Cathepsin K; *c-fos*: Cellular oncogene fos; NFATc1: Nuclear factor of activated T-cell c1

1.6 成骨细胞 ALP 染色及其活性测定 成骨细胞在干预 7 d 后采用 4% 多聚甲醛溶液 [E672002, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 固定 15 min, 用 ALP 染色试剂盒 [D720338, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 37 °C 条件下染色 30 min, 磷酸盐缓冲液清洗后, 分别用 Canon 相机 (650D) 和倒置光学显微镜 (日本 Olympus 公司, 40 \times) 观察并拍照, 分化的成骨细胞被染成蓝色, ALP 染色强度用于评估成骨分化的程度。

同样条件培养及干预成骨细胞 7 d 后收集各组细胞, 20 000×g 离心 5 min, 对细胞沉淀采用 BCA 法检测蛋白浓度, 同时对等量的细胞沉淀采用 ALP 活性检测试剂盒 (美国 Sigma 公司) 进行检测, 37 °C 条件下孵育 30 min, 用分光光度计 (美国 Molecular Devices 公司) 测量 450 nm 波长处的光密度 (D) 值, 各组 ALP 活性值采用蛋白浓度值进行标准化处理。

1.7 成骨细胞茜素红 S 染色及定量分析 成骨细胞在干预 14 d 后, 采用 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min, 用 0.2% 茜素红 S 溶剂 (美国 Sigma 公司) 在 37 °C 条件下染色 30 min, 磷酸盐缓冲液清洗后, 分别用 Canon 相机和倒置光学显微镜观察并拍照, 被染成红色的部分为钙结节。茜素红 S 染色后加入 5% 的高氯酸, 37 °C 避光孵育 30 min, 用分光光度计测量 420 nm 波长处的 D 值, 并进行定量分析。

1.8 Trap 染色检测破骨细胞形成数量 破骨细胞诱导分化成熟 (7 d) 后, 采用 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min, 用 Trap 染色试剂盒 (美国 Sigma 公司) 于室温下染色 30 min, 镜下多核且呈红色的细胞即为破骨细胞, 倒置光学显微镜下拍摄后进行细胞计数, 每孔随机选择 6 个视野, 取平均值, 实验重复 3 次。

1.9 骨片陷窝实验评估破骨细胞骨吸收活性 具体方法参考文献 [16], 将脱水消毒后的牛皮质骨片修剪至 5 mm×5 mm×1 mm 大小, 预先铺至 24 孔板中, 然后将分离后的单核细胞铺至骨片上进行培养及干预, 诱导 7 d 后取出骨片, 放置于 1 mol/L 的氨水中超声处理 10 min, 去除骨片上的残余细胞; 然后用 1% 甲苯胺蓝和硼酸钠染色 1 min, 光学显微镜下观察陷窝被染成深蓝色, 随机选择 6 个视野, 计算陷窝面积, 取平均值, 实验重复 3 次。

1.10 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 比色法检测 SrR 对成骨细胞与破骨细胞活性的影响 将成骨细胞 (5×10^4 /mL) 接种于 96 孔板, 200 μ L/孔, 用成骨细胞诱导液培养, 细胞贴壁后, 弃上清, 然后用含不同浓度 (0、1、10 mmol/L) SrR 的培养液培养。对于破骨细胞, 将 BMMC (5×10^5 /mL) 接种于 96 孔板, 用含 50 ng/mL M-CSF 的培养液培养, 并给予不同浓度 (0、1、10 mmol/L) SrR 干预。2 种细胞均在 SrR 干预 3 d 后, 于每孔细胞中添加 MTT 混合液 (5 mg/mL) 继续孵育 2 h。孵育结束时小心吸去孔

内上清液, 每孔加入二甲基亚砷, 震荡 10 min, 用瑞士 TECAN infinite 200 型酶标仪测定 450 nm 波长处各孔 D 值, 取平均值。

1.11 统计学处理 应用 SPSS 20.0 软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 SrR 诱导 *oim* 小鼠成骨细胞分化相关基因的表达 与 wt/wt 小鼠成骨细胞相比, *oim/oim* 小鼠成骨细胞分化相关基因 Runx2、ALP、OCN 的 mRNA 和蛋白表达水平均降低 (P 均 < 0.05)。*oim/oim* 小鼠的成骨细胞在给予不同浓度 (1、10 mmol/L) SrR 干预 7 d 后, 无论 mRNA 水平还是蛋白水平 SrR 均呈剂量依赖方式促进成骨细胞分化相关基因 Runx2、ALP、OCN 的表达 (P 均 < 0.05)。见图 1。

2.2 SrR 促进 *oim* 小鼠成骨细胞分化及矿化 ALP 染色结果显示 *oim/oim* 小鼠成骨细胞中的 ALP 活性低于 wt/wt 小鼠 (P < 0.05), SrR 干预可增强 *oim/oim* 小鼠成骨细胞中的 ALP 活性并呈剂量依赖性 (P < 0.05, 图 2A)。同样, 茜素红 S 染色结果也显示, *oim/oim* 小鼠成骨细胞中的钙结节形成数量少于 wt/wt 小鼠 (P < 0.05), 而给予 SrR 干预后 *oim/oim* 小鼠成骨细胞中的钙结节形成数量随着 SrR 浓度增加而增多 (P < 0.05, 图 2B)。

2.3 SrR 抑制 *oim* 小鼠破骨细胞分化相关基因的表达 与 wt/wt 小鼠破骨细胞对比, *oim/oim* 小鼠破骨细胞分化相关基因 Calcrc、Trap、CTSK 的 mRNA 和蛋白表达水平均升高 (P 均 < 0.05), *oim/oim* 小鼠的破骨细胞在给予不同浓度 (1、10 mmol/L) SrR 干预 7 d 后, 无论 mRNA 水平还是蛋白水平 SrR 均呈剂量依赖方式抑制破骨细胞分化相关基因 Calcrc、Trap、CTSK 的表达 (P 均 < 0.05, 图 3A~3F)。SrR 干预条件下, c-fos 和 NFATc1 蛋白表达水平均降低 (P 均 < 0.05, 图 3G~3I)。

2.4 SrR 抑制 *oim* 小鼠破骨细胞形成数量并降低其骨吸收能力 Trap 染色结果显示, *oim/oim* 小鼠的破骨细胞形成数量多于 wt/wt 小鼠, 差异有统计学意义 (P < 0.05), SrR 干预可抑制 *oim/oim* 小鼠破骨细胞形成数量并呈剂量依赖性 (P < 0.05, 图 4)。骨片陷窝实验结果显示, *oim/oim* 小鼠的破骨细胞骨吸收活性高于 wt/wt 小鼠 (P < 0.05), 而给予 SrR 干预后 *oim/oim* 小鼠的破骨细胞骨吸收活性随着 SrR 浓度增加而下降 (P < 0.05, 图 5)。

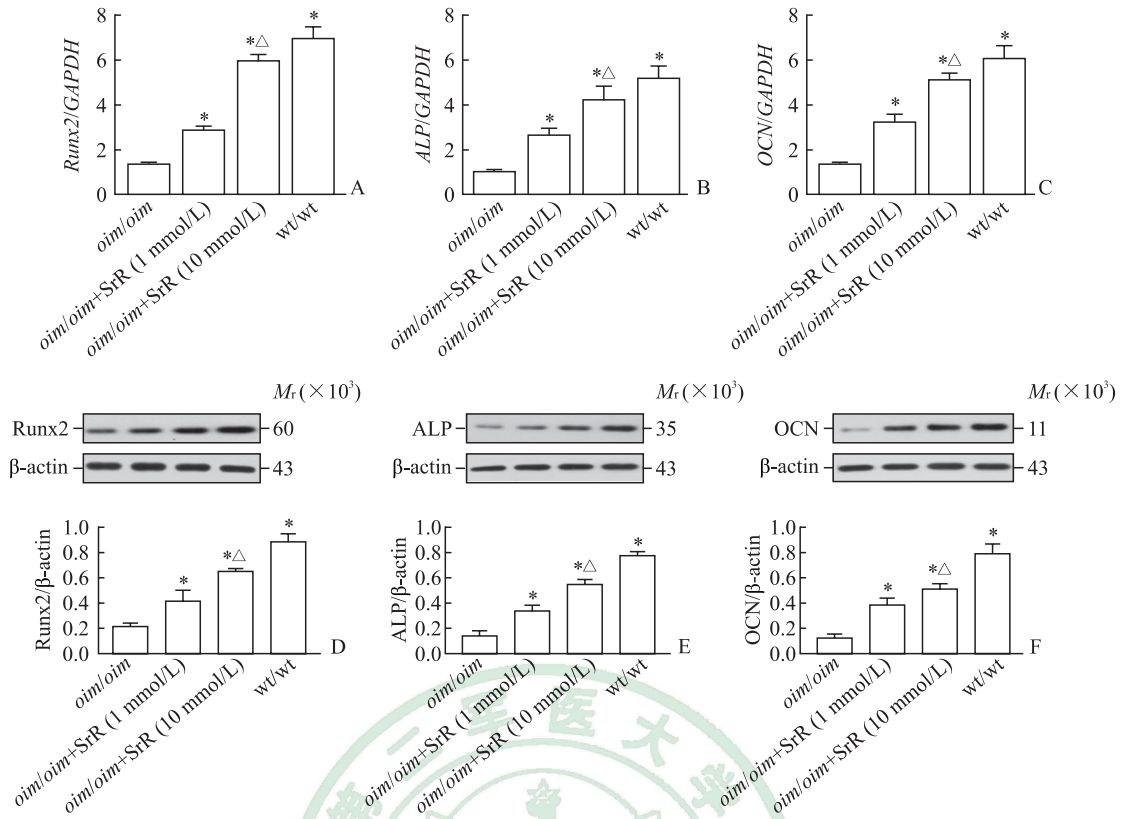


图1 qRT-PCR和蛋白质印迹法检测SrR促进成骨细胞分化

Fig 1 SrR stimulating differentiation of osteoblasts *in vitro* measured by qRT-PCR and Western blotting

A-C: qRT-PCR; D-F: Western blotting. qRT-PCR: Quantitative real-time polymerase chain reaction; SrR: Strontium ranelate; Runx2: Runt-related transcription factor 2; ALP: Alkaline phosphatase; OCN: Osteocalcin; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; wt/wt: Wild type. * $P < 0.05$ vs *oim/oim* group; $\Delta P < 0.05$ vs *oim/oim* + SrR (1 mmol/L) group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

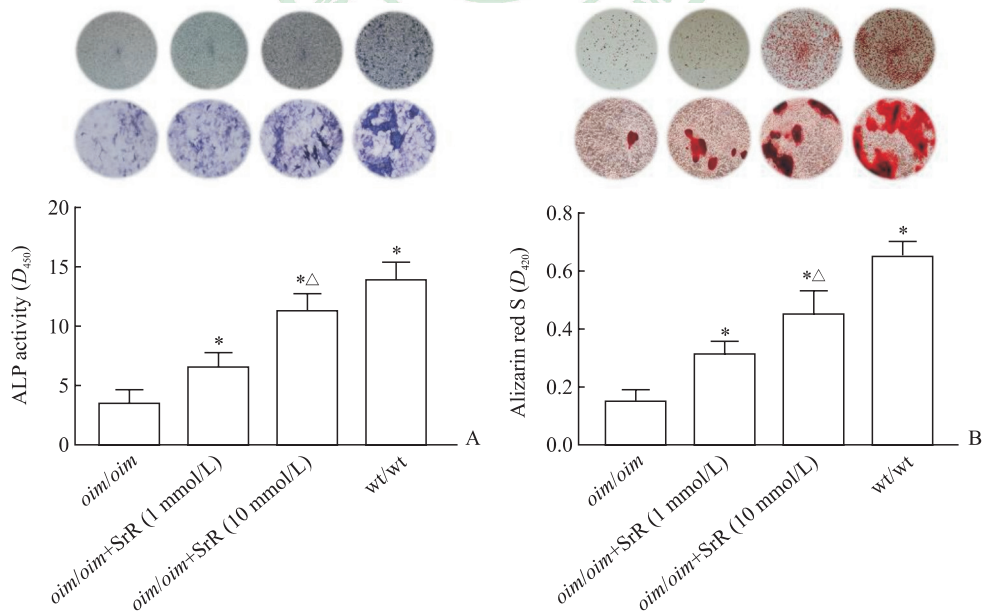


图2 ALP染色和茜素红S染色检测SrR促进成骨细胞分化及矿化

Fig 2 SrR promoting osteoblast differentiation and mineralization *in vitro* measured by ALP and alizarin red S staining

A: Representative pictures of ALP staining (original magnification: $\times 40$) and ALP activity outcomes; B: Representative pictures of alizarin red S staining (original magnification: $\times 40$) and quantitative analysis outcomes. SrR: Strontium ranelate; ALP: Alkaline phosphatase; wt/wt: Wild type. * $P < 0.05$ vs *oim/oim* group; $\Delta P < 0.05$ vs *oim/oim* + SrR (1 mmol/L) group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

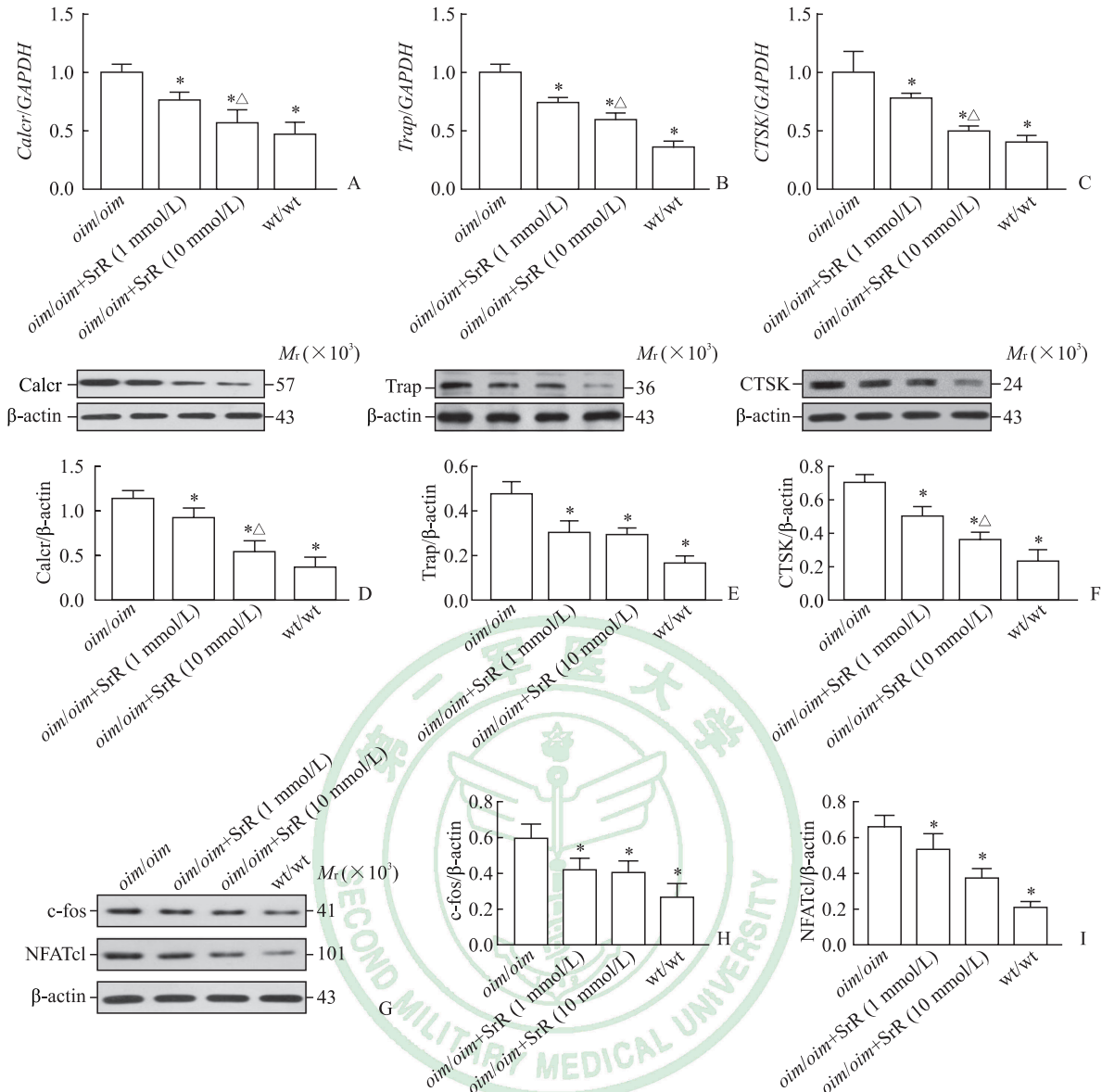


图3 qRT-PCR和蛋白质印迹法检测SrR抑制破骨细胞分化

Fig 3 SrR inhibiting differentiation of osteoclasts *in vitro* measured by qRT-PCR and Western blotting

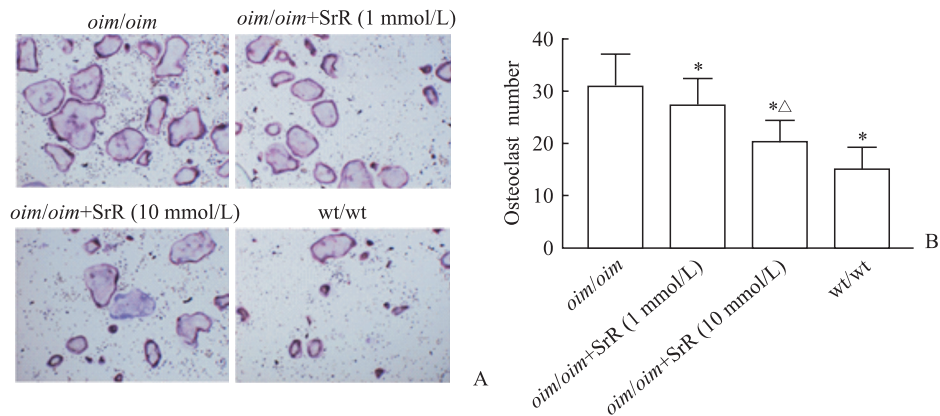
A-C: qRT-PCR outcomes of *Calcr*, *Trap* and *CTSK*; D-F: Western blotting outcomes of *Calcr*, *Trap*, and *CTSK*; G-I: Western blotting outcomes of *c-fos* and *NFATc1*. qRT-PCR: Quantitative real-time polymerase chain reaction; SrR: Strontium ranelate; *Calcr*: Calcitonin receptor; *Trap*: Tartrate-resistant acid phosphatase; *CTSK*: Cathepsin K; *c-fos*: Cellular oncogene fos; *NFATc1*: Nuclear factor of activated T-cell c1; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; wt/wt: Wild type. * $P < 0.05$ vs *oim/oim* group; $\Delta P < 0.05$ vs *oim/oim*+SrR (1 mmol/L) group. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

2.5 SrR 对 *oim* 小鼠的成骨细胞和破骨细胞均无毒性 *oim/oim* 小鼠成骨细胞给予不同浓度 (0、1、10 mmol/L) SrR 干预 3 d 后, MTT 孵育 2 h 后的 D_{450} 值分别为 1.91 ± 0.17 、 1.89 ± 0.21 、 2.04 ± 0.19 , 10 mmol/L SrR 与 0 mmol/L SrR 之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。提示 SrR 对 *oim* 小鼠的成骨细胞无明显毒性, SrR 可能促进 *oim* 小鼠成骨细胞增殖。*oim/oim* 小鼠 BMMC 给予不同浓度 (0、1、10 mmol/L) SrR 干预 3 d 后, MTT 孵育 2 h 后的 D_{450} 值分别为 1.85 ± 0.17 、 1.83 ± 0.14 、 1.86 ± 0.16 , 差异

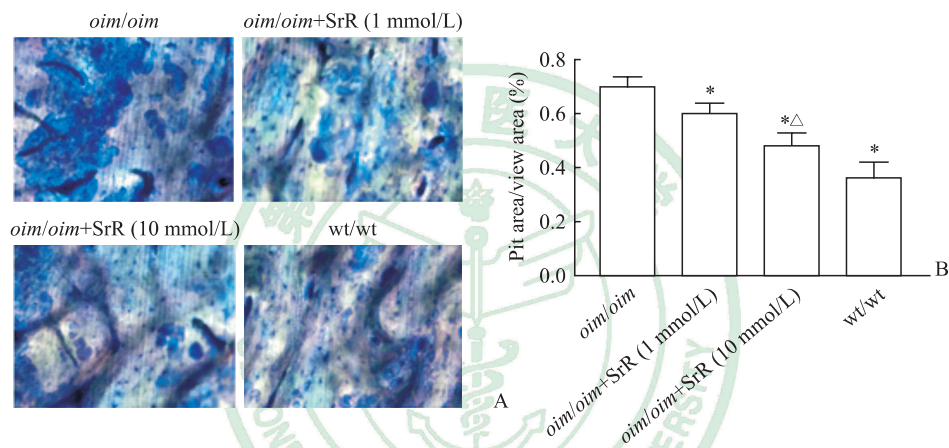
无统计学意义 ($P > 0.05$)。提示 SrR 对 *oim* 小鼠的破骨细胞活性无明显影响。

3 讨论

SrR 对骨代谢具有双重作用, 既能促进骨形成又能抑制骨吸收, 从而有效改善骨的几何特性及微观结构、增加骨量及骨矿化^[17-18]。本研究在前期动物实验^[15]基础上, 通过体外细胞学实验发现 SrR 可促进 *oim* 小鼠的成骨细胞分化及矿化, 同时抑制 *oim* 小鼠的破骨细胞形成及骨吸收活性。

图4 SrR抑制 *oim* 小鼠破骨细胞形成Fig 4 SrR inhibiting osteoclastogenesis of *oim* mice *in vitro*

A: Trap staining pictures of osteoclasts (original magnification: $\times 40$); B: Numbers of osteoclasts based on Trap staining. SrR: Strontium ranelate; wt/wt: Wild type. * $P < 0.05$ vs *oim/oim* group; $\Delta P < 0.05$ vs *oim/oim* + SrR (1 mmol/L) group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

图5 SrR抑制 *oim* 小鼠破骨细胞骨吸收能力Fig 5 SrR inhibiting osteoclast bone resorption of *oim* mice *in vitro*

A: Pit formations of osteoclast resorption (original magnification: $\times 40$); B: Resorption rate of osteoclasts detected by pit formation assay. SrR: Strontium ranelate; wt/wt: Wild type. * $P < 0.05$ vs *oim/oim* group; $\Delta P < 0.05$ vs *oim/oim* + SrR (1 mmol/L) group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

I型胶原是骨细胞外基质的主要成分, 约占骨有机质的90%, 对于维持骨架完整性和骨骼功能至关重要^[19-20]。成骨过程中, I型胶原不仅能够引导钙盐沉积、矿化及羟基磷灰石晶体的形成^[21], 还能作为细胞外信号分子结合特异性受体整合素 $\alpha 2\beta 1$ 、激活黏附斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK)、介导细胞内信号转导、诱导成骨细胞分化及黏附等过程^[22-23]。OI患者由于 *Colla1* 和 *Colla2* 基因突变, 导致I型胶原结构异常或含量缺乏, 进而造成成骨细胞分化及矿化障碍。Li等^[24]研究发现, *oim*小鼠的成骨细胞处于不断增殖状态, 但仅有一小部分分化至成熟阶段, 大部分成骨细胞仍处于未分化阶段。成骨细胞与破骨细胞共同参与调节骨代谢, OI中不仅存在成骨细胞分化及矿化障碍, 同时还存在破骨细胞活跃。Li等^[24]将 *oim*小鼠未分化成熟的成骨细胞、wt/wt小鼠的正常成骨细胞分别与破骨细胞共

培养, 发现 *oim*小鼠的破骨细胞形成能力及骨吸收活性增强, 其机制可能与未分化的成骨细胞高表达RANKL和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 有关。由此可见, 成骨细胞-破骨细胞的平衡障碍是OI的重要致病机制。

根据OI的发病机制, 治疗OI的理想药物应具备促进成骨细胞成熟、抑制破骨细胞活性的双重作用。目前研究发现SrR对骨代谢具有双重作用, 几项针对骨质疏松的大规模多中心随机对照研究 (SOTI^[25]、TROPOS^[12,25]、STRATOS^[26]) 均表明, SrR可降低髌骨骨折和外周骨折的发生风险, 增加腰椎骨密度、降低脊柱骨折发生率33%~41%, 且长期使用安全、有效。本课题组前期考察了SrR治疗OI的疗效, 结果发现SrR可降低OI模型小鼠的骨折发生率^[15], 但具体机制尚不明确。

ALP能调节局部钙、磷水平, 促进骨间质矿化,

ALP 活性的高低是反映早期成骨细胞分化的关键生物学指标之一^[27]; *Runx2* 是成骨分化的标志性基因, 而 OCN 反映成骨细胞矿化及成熟情况。既往研究发现, SrR 改善去卵巢骨质疏松大鼠的骨结构, 同时伴随血清中 ALP 和 OCN 含量的增加^[28], 提示 SrR 可能通过促进成骨细胞分化及矿化发挥作用。进一步体外实验表明, SrR 可诱导成骨细胞系 MC3T3-E1 中 ALP 的表达增加, 但不影响 MC3T3-E1 的矿化^[29]。Bonnelye 等^[30]体外培养小鼠颅骨来源成骨细胞, 发现 SrR 可诱导成骨前体细胞向成熟成骨细胞分化、增加成骨结节形成, 不仅如此, 成骨早期分化基因和晚期分化基因 *ALP*、*OCN*、骨唾液酸蛋白 (bone sialoprotein, *BSP*) 的表达在 SrR 作用下也上调。SrR 对正常小鼠及去卵巢大鼠的成骨细胞的促进作用与其对 OI 小鼠成骨细胞的作用类似, 本研究以 *oim* 小鼠的成骨细胞为研究对象, 发现 SrR 同样可促进 *oim* 小鼠成骨细胞的早期及晚期分化基因表达, 并诱导钙结节形成。结合前期体内实验研究结果^[15], 提示 SrR 降低 *oim* 小鼠骨折发生率的机制可能是通过诱导小鼠体内尚未分化的成骨细胞向成熟阶段分化及矿化而实现。

破骨细胞是机体内唯一具有溶骨作用的细胞, 异常激活破骨细胞可导致骨密度降低, 进而导致骨代谢疾病的发生^[31]。破骨细胞由单核细胞聚集而成, *NFATc1* 和 *Trap* 是破骨细胞分化及形成的标志性基因, 而 *CTSK* 反映破骨细胞吸收活性。既往研究发现, SrR 可导致绝经后骨质疏松模型大鼠的破骨细胞数量和表面积降低, 同时伴随血清中 *Trap* 含量及 I 型胶原 N 末端肽水平下降^[28], 提示 SrR 可能通过抑制破骨活性达到减少骨量丢失的效果。进一步体外分离 BMMC 进行培养, SrR 干预后多核破骨细胞形成受到抑制, 象牙骨皮质吸收实验结果也显示 SrR 可抑制破骨细胞骨吸收活性, 其机制可能是通过破坏破骨细胞中的微丝肌动蛋白骨架结构从而干扰破骨细胞与骨质之间的贴附过程^[30]。本实验采用不同浓度 SrR 作用于 OI 的破骨细胞, 破骨细胞分化相关基因 *Calcr*、*Trap*、*CTSK* 及相关信号通路分子 *c-fos* 和 *NFATc1* 的表达水平均降低, 且 *Trap* 染色及骨片陷窝实验显示, SrR 干预后 *oim* 小鼠的破骨细胞形成数量及破骨吸收面积均减少, 细胞活性检测发现 SrR 干预条件下 BMMC 的活性并未降低, 提示 SrR 可能通过抑制破骨细胞的形成及骨吸收活性而减少 OI 中骨质的破坏。

本研究通过体外实验验证了 SrR 对 OI 异常骨代谢的双重作用。本研究结果提示, SrR 降低 OI

骨折发生率的机制可能是通过促进成骨分化相关基因 *Runx2*、*ALP* 及 *OCN* 的表达, 从而诱导 OI 未分化的成骨细胞向成熟阶段分化; 同时 SrR 还抑制破骨细胞形成及其骨吸收活性, 从而减少 OI 中骨质的破坏。本研究结果为 SrR 临床治疗 OI 奠定了一定的理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] KANG H, ARYAL A C S, MARINI J C. Osteogenesis imperfecta: new genes reveal novel mechanisms in bone dysplasia[J]. *Transl Res*, 2017, 181: 27-48.
- [2] MARINI J C, FORLINO A, BÄCHINGER H P, BISHOP N J, BYERS P H, PAEPE A, et al. Osteogenesis imperfecta[J/OL]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17053. doi: 10.1038/nrdp.2017.52.
- [3] PALOMO T, VILAÇA T, LAZARETTI-CASTRO M. Osteogenesis imperfecta: diagnosis and treatment[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2017, 24: 381-388.
- [4] GIL J A, DEFRODA S F, SINDHU K, GRUZ A I Jr, DANIELS A H. Challenges of fracture management for adults with osteogenesis imperfecta[J/OL]. *Orthopedics*, 2017, 40: e17-e22. doi: 10.3928/01477447-20161006-04.
- [5] MORELLO R. Osteogenesis imperfecta and therapeutics[J]. *Matrix Biol*, 2018, 71/72: 294-312.
- [6] HALD J D, EVANGELOU E, LANGDAHL B L, RALSTON S H. Bisphosphonates for the prevention of fractures in osteogenesis imperfecta: meta-analysis of placebo-controlled trials[J]. *J Bone Miner Res*, 2015, 30: 929-933.
- [7] TREJO P, FASSIER F, GLORIEUX F H, RAUCH F. Diaphyseal femur fractures in osteogenesis imperfecta: characteristics and relationship with bisphosphonate treatment[J]. *J Bone Miner Res*, 2017, 32: 1034-1039.
- [8] UVEGES T E, KOZLOFF K M, TY J M, LEDGARD F, RAGGIO C L, GRONOWICZ G, et al. Alendronate treatment of the Brlt osteogenesis imperfecta mouse improves femoral geometry and load response before fracture but decreases predicted material properties and has detrimental effects on osteoblasts and bone formation[J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24: 849-859.
- [9] BIGGIN A, MUNNS C F. Long-term bisphosphonate therapy in osteogenesis imperfecta[J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2017, 15: 412-418.
- [10] LLOYD A A, GLUDOVATZ B, RIEDEL C, LUENGO E A, SAIYED R, MARTY E, et al. Atypical fracture with long-term bisphosphonate therapy is associated with altered cortical composition and reduced fracture resistance[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 8722-8727.
- [11] REGINSTER J Y, DEROISY R, JUPSIN I. Strontium ranelate: a new paradigm in the treatment of

- osteoporosis[J]. *Drugs Today (Barc)*, 2003, 39: 89-101.
- [12] REGINSTER J Y, SEEMAN E, DE VERNEJOU M C, ADAMI S, COMPSTON J, PHENEKOS C, et al. Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90: 2816-2822.
- [13] MEUNIER P J, ROUX C, SEEMAN E, ORTOLANI S, BADURSKI J E, SPECTOR T D, et al. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350: 459-468.
- [14] CHIPMAN S D, SWEET H O, MCBRIDE D J Jr, DAVISSON M T, MARKS S C Jr, SHULDINER A R, et al. Defective pro α 2(I) collagen synthesis in a recessive mutation in mice: a model of human osteogenesis imperfecta[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 1701-1705.
- [15] SHI C, HU B, GUO L, CAO P, TIAN Y, MA J, et al. Strontium ranelate reduces the fracture incidence in a growing mouse model of osteogenesis imperfecta[J]. *J Bone Miner Res*, 2016, 31: 1003-1014.
- [16] SHI C, QI J, HUANG P, JIANG M, ZHOU Q, ZHOU H, et al. MicroRNA-17/20a inhibits glucocorticoid-induced osteoclast differentiation and function through targeting RANKL expression in osteoblast cells[J]. *Bone*, 2014, 68: 67-75.
- [17] PEI Y, ZHENG K, SHANG G, WANG Y, WANG W, QIU E, et al. Therapeutic effect of strontium ranelate on bone in chemotherapy-induced osteopenic rats via increased bone volume and reduced bone loss[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2019, 187: 472-481.
- [18] QUADE M, VATER C, SCHLOOTZ S, BOLTE J, LANGANKE R, BRETSCHNEIDER H, et al. Strontium enhances BMP-2 mediated bone regeneration in a femoral murine bone defect model[J/OL]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2019. doi: 10.1002/jbm.b.34376.
- [19] GARNERO P. The role of collagen organization on the properties of bone[J]. *Calcif Tissue Int*, 2015, 97: 229-240.
- [20] BARBER L A, ABBOTT C, NAKHATE V, DO A N D, BLISSETT A R, MARINI J C. Longitudinal growth curves for children with classical osteogenesis imperfecta (types III and IV) caused by structural pathogenic variants in type I collagen[J]. *Genet Med*, 2019, 21: 1233-1239.
- [21] WANG Y, AZAÏS T, ROBIN M, VALLÉE A, CATANIA C, LEGRIEL P, et al. The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite[J]. *Nat Mater*, 2012, 11: 724-733.
- [22] STANGE R, KRONENBERG D, TIMMEN M, EVERDING J, HIDDING H, ECKES B, et al. Age-related bone deterioration is diminished by disrupted collagen sensing in integrin α 2 β 1 deficient mice[J]. *Bone*, 2013, 56: 48-54.
- [23] TAKEUCHI Y, SUZAWA M, KIKUCHI T, NISHIDA E, FUJITA T, MATSUMOTO T. Differentiation and transforming growth factor- β receptor down-regulation by collagen- α 2 β 1 integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 29309-29316.
- [24] LI H, JIANG X, DELANEY J, FRANCESCHETTI T, BILIC-CURCIC I, KALINOVSKY J, et al. Immature osteoblast lineage cells increase osteoclastogenesis in osteogenesis imperfecta murine[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176: 2405-2413.
- [25] REGINSTER J Y, BRUYÈRE O, SAWICKI A, ROCES-VARELA A, FARDELLONE P, ROBERTS A, et al. Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis with strontium ranelate: results at 8 years[J]. *Bone*, 2009, 45: 1059-1064.
- [26] MEUNIER P J, SLOSMAN D O, DELMAS P D, SEBERT J L, BRANDI M L, ALBANESE C, et al. Strontium ranelate: dose-dependent effects in established postmenopausal vertebral osteoporosis—a 2-year randomized placebo controlled trial[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87: 2060-2066.
- [27] PARK C S, HA T H, KIM M, RAJA N, YUN H S, SUNG M J, et al. Fast and sensitive near-infra red fluorescent probes for ALP detection and 3D printed calcium phosphate scaffold imaging *in vivo*[J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 105: 151-158.
- [28] MARIE P J, HOTT M, MODROWSKI D, DE POLLAK C, GUILLEMAIN J, DELOFFRE P, et al. An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats[J]. *J Bone Miner Res*, 1993, 8: 607-615.
- [29] BARBARA A, DELANNOY P, DENIS B G, MARIE P J. Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells[J]. *Metabolism*, 2004, 53: 532-537.
- [30] BONNELYE E, CHABADEL A, SALTEL F, JURDIC P. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption *in vitro*[J]. *Bone*, 2008, 42: 129-138.
- [31] NG P Y, BRIGITTE PATRICIA RIBET A, PAVLOS N J. Membrane trafficking in osteoclasts and implications for osteoporosis[J]. *Biochem Soc Trans*, 2019, 47: 639-650.