



第四军医大学

The Fourth Military Medical University

分类号 R852.22

U D C 612.7

密 级 公 开

硕士学位论文

回转模拟失重通过激活 miR-103/Cav1.2 信号通路抑制 MC3T3-E1 前成骨细胞增殖的研究

孙中洋

培 养 类 别 全日制

学 位 类 型 学术学位

一级学科(专业类) 特种医学

二级学科(专业) 航空、航天与航海医学

研 究 方 向 失重性骨质丢失的机制

指 导 教 师 张 舒 教授

培 养 单 位 航空航天生物动力学教研室

二〇一五年五月

独创性声明

秉承学校严谨的学风与优良的科学道德，本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，不包含本人或他人已申请学位或其他用途使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了致谢。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

论文作者签名：_____ 日期：_____

保护知识产权明

本人完全了解第四军医大学有关保护知识产权的规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位为第四军医大学。本人保证毕业后，发表论文等使用本论文工作成果时第一署名单位仍然为第四军医大学。学校可以公布论文的全部或部分内容（含电子版，保密内容除外），可以采用影印，缩印或其他复制手段保存论文；学校有权允许论文被查阅和借阅，并在校园网上提供论文内容的浏览和下载服务。同意学校将论文加入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》和编入《中国知识资源总库》等，并可浏览和下载，同时享受《中国优秀博硕士学位论文全文数据库出版章程》规定的相关权益。

论文作者签名：_____ 导师签名：_____ 日期：_____

目 录

缩略语表	1
中文摘要	3
英文摘要	6
前 言	11
文献回顾	13
正 文	28
第一部分 模拟失重抑制 MC3T3-E1 前成骨细胞的增殖	28
1 材料	28
2 方法	30
3 结果	33
4 讨论	35
第二部分 模拟失重抑制 MC3T3-E1 前成骨细胞上 L 型钙离子通道的功能	37
1 材料	38
2 方法	38
3 结果	41
4 讨论	50
第三部分 模拟失重通过 miR-103/Cav1.2 信号通路抑制 MC3T3-E1 前成骨细胞的增殖	53
1 材料	54
2 方法	55
3 结果	60
4 讨论	71
小 结	74
参考文献	76
个人简历和研究成果	91
致 谢	93

缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
ALP	Alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
BMPs	Bone morphogenetic proteins	骨形态生成蛋白
CREB	cAMP-response element-binding protein	环磷酸腺苷反应元件结合蛋白
cDNA	Complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
DEPC	Diethylpyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline	杜氏磷酸缓冲液
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
ENaC	Epithelial sodium channel	上皮钠离子通道
EGF	Epidermal growth factor	表皮生长因子
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
ERK	Extracellular signal-regulated kinase	细胞外信号调节激酶
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IGF	Insulin-like growth factor	胰岛素样生长因子
IL-1	Interleukin 1	白细胞介素 1
LTCCs	L-type calcium channels	L型电压依赖型钙离子通道
miRNA	microRNA	微小 RNA
MSCs	Mesenchymal stem cells	骨髓间充质干细胞

Nav	Voltage-sensitive sodium channels	电压敏感性钠离子通道
NC	Negative control	阴性对照
OCN	Osteocalcin	骨钙素
OD	Optical density	光密度
ON	Osteonectin	骨粘连蛋白
OP	Osteoporosis	骨质疏松症
OPN	Osteopontin	骨桥蛋白
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PTH	Parathyroid hormone	甲状旁腺激素
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏氟乙烯
RNAi	RNA interference	RNA 干扰
rpm	Revolutions per minute	转数/每分
Runx2	Runt-related transcription factor 2	Runt 相关转录因子 2
siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA
SUS	Suspension	悬吊
TBST	Tris-buffered saline with tween-20	洗涤缓冲液
TNF	Tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
UTR	Untranslated region	非翻译区
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
VSCCs	Voltage-sensitive calcium channels	电压敏感性钙离子通道

回转模拟失重通过激活 miR-103/Cav1.2 信号通路抑制 MC3T3-E1 前成骨细胞增殖的研究

硕士研究生：孙中洋

导 师：张 舒 教 授

谢满江 副教授

辅 导 教 师：曹新生 副教授

第四军医大学航空航天医学系航空航天生物动力学教研室，西安 710032

资助基金项目：国家自然科学基金（31170889）

国家自然科学基金（30870595）

国家自然科学基金（81471815）

中文摘要

研究背景

骨密度的保持和骨骼结构的发育依赖于机械力学刺激。研究表明，机械力学刺激在骨重塑过程中促进骨形成，然而在长期制动或是失重环境下的去负荷状态导致骨质丢失。失重环境暴露可引起航天员各系统功能失调，其中最为严重的是非自限性骨质丢失，这将会增加航天员发生骨折的危险。长时间的失重暴露使骨质生成减少，骨质吸收增加。失重诱导的骨质丢失能够以骨密度每个月接近 2% 的速度下降，此种去负荷环境作用下一个月的骨质丢失量和绝经期妇女一年的骨质丢失量相当。研究已证实，成骨细胞增殖能力的减弱在失重性骨质丢失的过程中扮演重要角色，但具体机制尚不清楚。

研究表明，钙离子是成骨细胞的重要调节因子，而钙离子通道，特别是 L 型电压依赖型钙离子通道（L-type calcium channels, LTCCs）在机械刺激诱导的成骨细胞

增殖中发挥重要作用。一些证据表明，当 LTCCs 被激活时，骨密度增加伴随骨溶解减少。应用特异性 LTCCs 阻断剂，维拉帕米或 nifedipine 作用于成骨细胞可阻断机械刺激诱导的成骨细胞增殖。另有研究表明，机械刺激能够促进成骨细胞细胞外基质分泌增加，而应用特异性 LTCCs 阻断剂后此效应消失。所以 LTCCs 在成骨细胞增殖中发挥重要作用，且对力学信号敏感。

LTCCs 的调控因素很多，近年来 miRNAs 成为 LTCCs 调控的研究热点。miRNAs 通过碱基互补原则与 mRNA 的特异性结合沉默 mRNA，是重要的基因转录后调控机制。目前，已知有多条 miRNAs 能够调控 LTCCs，但在成骨细胞上鲜有研究报道。

目的

验证回转器模拟失重对成骨细胞增殖能力的影响；观察模拟失重环境下成骨细胞 LTCCs 的功能变化情况并探究相关机制；探索 miR-103/Cav1.2 信号通路在模拟失重环境下对成骨细胞增殖的调控作用。

方法

1. 采用 EdU 染色、PCNA 蛋白含量检测和 CCK-8 方法检测模拟失重环境下成骨细胞增殖的变化情况；
2. 利用 Calcium imaging 和膜片钳的方法检测模拟失重对成骨细胞 LTCCs 功能的影响；通过 Western blotting 技术检测模拟失重环境下成骨细胞 Cav1.2 蛋白表达情况；构建 Cav1.2 的小干扰 RNA 片段，并进行效率检测；将沉默效率较高的 Cav1.2 siRNA 利用脂质体法转染进成骨细胞后，采用膜片钳技术检测 LTCCs 功能变化；利用 LTCCs 特异性阻断剂 nifedipine 和 Cav1.2 siRNA 阻断 LTCCs 功能，而后通过 CCK-8 方法检测成骨细胞在模拟失重环境下增殖情况的变化；
3. 通过 Northern blotting 技术和实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测模拟失重对成骨细胞 Cav1.2 mRNA 表达的影响；利用 qPCR 筛选出在模拟失重环境下差异表达的能够靶向调控 Cav1.2 的 miRNA；构建 miR-103 的 mimic 和 inhibitor，并用 qPCR 确认其作用效果；将 miR-103 inhibitor 利用脂质体法转染进成骨细胞后，通过 Western blotting 技术检测模拟失重环境下成骨细胞 Cav1.2 蛋白表达，并且利用膜片钳技术检测 LTCCs 功能变化；将 miR-103 的 mimic 和 inhibitor 分别转染进细胞，而后通过 CCK-8 方法检测成骨细胞在模拟失重环境下增殖情况；利用脂质体法将 miR-103 的 mimic 或 inhibitor 分别和 Cav1.2 siRNA 共转染进细胞，而

后利用 CCK-8 方法检测成骨细胞在模拟失重环境下增殖情况。

结果

1. 模拟失重降低成骨细胞 EdU 染色阳性率；模拟失重降低成骨细胞 PCNA 的表达；模拟失重抑制成骨细胞的活性。
2. 模拟失重抑制 Bay k8644 诱导的成骨细胞内钙离子浓度增高；模拟失重抑制成骨细胞上 LTCCs 的电活动；模拟失重下调成骨细胞 Cav1.2 蛋白的表达；Cav1.2 的表达下调抑制成骨细胞 LTCCs 的电活动；阻断 LTCCs 或下调 Cav1.2 表达加剧模拟失重对成骨细胞增殖的抑制作用。
3. 模拟失重上调成骨细胞 Cav1.2 mRNA 的表达；模拟失重上调成骨细胞 miR-103 的表达；降低 miR-103 的表达能够部分恢复模拟失重诱导的 Cav1.2 表达下调；降低 miR-103 的表达能够部分对抗模拟失重对 LTCCs 电活动的抑制作用；在模拟失重环境下 miR-103 抑制成骨细胞的增殖；在模拟失重环境下 miR-103 抑制成骨细胞的增殖是 Cav1.2 依赖的。

结论

1. 模拟失重抑制成骨细胞的增殖。模拟失重降低成骨细胞 EdU 染色阳性率、抑制成骨细胞 PCNA 蛋白的表达和细胞活性，从多个角度证实了模拟失重对成骨细胞增殖的抑制作用。此部分现象观察实验明确了模拟失重对成骨细胞增殖的抑制作用，为我们进一步开展机制探讨奠定了基础。
2. 模拟失重抑制成骨细胞上 LTCCs 的功能。模拟失重通过下调成骨细胞 Cav1.2 蛋白的表达抑制 LTCCs 的功能，从而负性调控成骨细胞的增殖。这为阐明失重对成骨细胞增殖的负性调控提供了一个新机制。
3. 模拟失重通过激活 miR-103/Cav1.2 信号通路抑制成骨细胞的增殖。模拟失重通过上调 miR-103，下调成骨细胞 Cav1.2 的表达，从而抑制 LTCCs 的电活动。而在模拟失重环境下 miR-103 对成骨细胞增殖的调控主要是通过 Cav1.2 实现的。至此，我们发现模拟失重通过激活 miR-103/Cav1.2 信号通路抑制成骨细胞的增殖。此项研究为失重对成骨细胞增殖的负性调控阐明了一个新机制，也为进一步研究失重性骨质丢失的细胞学机制提供了一个新方向。

关键词：模拟失重；成骨细胞；增殖；L 型电压依赖性钙离子通道；miR-103

Simulated microgravity inhibits MC3T3-E1 preosteoblasts proliferation by the activation of miR-103/Cav1.2 signaling pathway

Candidate for master: Sun Zhongyang

Supervisor: Zhang Shu

Xie Manjiang

Tutor: Cao Xinsheng

Department of Aerospace Biodynamics, Fourth Military Medical University,

Xi'an 710032, China

Sponsored Programs: The National Natural Science Foundation of China (31170889,
30870595 and 81471815).

Abstract

Background

The maintenance of bone mass and the development of skeletal architecture are dependent on mechanical stimulation. Numerous studies have shown that mechanical loading promotes bone formation in the skeleton, whereas the removal of this stimulus during immobilization or in microgravity results in reduced bone mass. Microgravity, which is the condition of weightlessness that is experienced by astronauts during spaceflight, causes severe physiological alterations in the human body. One of the most prominent physiological alterations is bone loss, which leads to an increased fracture risk. Long-term exposure to a microgravity environment leads to enhanced bone resorption and reduced bone formation over the period of weightlessness. An approximately 2% decrease in bone mineral density after only one month, which is equal to the loss experienced by a

postmenopausal woman over one year, occurs in severe forms of microgravity-induced bone loss. Experimental studies have shown that real or simulated microgravity can induce skeletal changes that are characterized by cancellous osteopenia in weight-bearing bones, decreased cortical and cancellous bone formation, altered mineralization patterns, disorganized collagen and non-collagenous proteins, and decreased bone matrix gene expression. Decreased osteoblast function has been thought to play a pivotal role in the process of microgravity-induced bone loss. Both in vivo and in vitro studies have provided evidence of decreased matrix formation and maturation when osteoblasts are subjected to simulated microgravity. The mechanism by which microgravity, which is a form of mechanical unloading, has detrimental effects on osteoblast functions remains unclear and merits further research.

Calcium is an important osteoblast regulator, and calcium channels, particularly LTCCs play fundamental roles in cellular responses to mechanical stimuli in osteoblastic lineage bone cells. Several lines of evidence have found that bone density increases and that bone resorption decreases when these calcium channels are activated in osteoblasts. The administration of the LTCC antagonist verapamil or nifedipine can substantially suppress mechanical loading-induced increases in bone formation in rats, suggesting that LTCCs mediate mechanically induced bone adaptation in vivo. The levels of the extracellular matrix proteins osteopontin and osteocalcin increased in periosteal-derived osteoblasts by applying strain alone or strain in the presence of the LTCC agonist Bay K8644 within 24 h post-load. This mechanically induced increase in osteopontin and osteocalcin was inhibited by nifedipine. Therefore, LTCCs play important roles in regulating osteoblasts proliferation and are sensitive to mechanical stimuli.

Recent studies have shown that many factors participate in LTCCs regulation. Among them, miRNAs, which is a small non-coding RNA molecule, has become the subject of many studies and functions in the silencing and post-transcriptional regulation of gene expression. miRNAs function via base-pairing with complementary sequences within mRNA molecules. Some miRNAs are reported to participate in regulating Cav1.2 expression in several types of cells, whereas their functions in osteoblasts have not been

confirmed.

Aims

We performed these experiments to confirm the effects of simulated microgravity on osteoblasts proliferation, to determine whether simulated microgravity can affect osteoblasts LTCCs and to investigate the functions and mechanisms of miR-103/Cav1.2 signaling pathway in regulating osteoblasts proliferation.

Methods

1. EdU labeling, PCNA expression detection and Cell Counting Kit-8 assay were performed to assess the effects of simulated microgravity on osteoblasts proliferation.
2. We conducted calcium imaging and patch clamp to explore the effects of simulated microgravity on LTCCs in osteoblasts. By using Western blotting, the expression of Cav1.2 was determined. In addition, the siRNA of Cav1.2 was constructed and western blotting was used to evaluate gene knockdown efficiency following siRNA transfection. Then, the cells were subjected to patch clamp at post-transfection. Moreover, we administrated the LTCC antagonist nifedipine or Cav1.2 siRNA before Cell Counting Kit-8 assay was performed to investigate osteoblasts proliferation under simulated microgravity condition.
3. The effects of simulated microgravity on Cav1.2 mRNA expression was observed by Northern blotting and qPCR. Additionally, qPCR was used to screen differential expression miRNAs which directly targeted Cav1.2 mRNA. Furthermore, mimic and inhibitor of miR-103 was constructed and qPCR analyzed miR-103 levels in MC3T3-E1 cells after treated with miR-103 mimic, miR-103 inhibitor or their negative controls. Then, a miR-103 inhibitor was transfected into MC3T3-E1 cells, and western blot analyses and patch clamp were performed to test for Cav1.2 expression and LTCCs currents density respectively. Liposome was used to transfect miR-103 mimic or miR-103 inhibitor into MC3T3-E1 cells, and we examined osteoblasts proliferation by EdU labeling, PCNA expression detection and Cell Counting Kit-8 assay. Finally, miR-103 mimic or inhibitor were co-transfected with Cav1.2 siRNA or its negative control by liposome, and Cell Counting Kit-8 assay was

conducted to examine osteoblasts proliferation.

Results

1. Simulated microgravity suppresses the percentage of EdU positive osteoblasts, down-regulates of PCNA expression and inhibits osteoblasts viability.
2. Simulated microgravity attenuates the Bay K8644-induced increase in the intracellular calcium concentration and reduces LTCC currents in osteoblasts. Cav1.2 protein level is down-regulated under simulated microgravity condition. And Cav1.2 knockdown reduces LTCC currents density. Moreover, Cav1.2 knockdown or LTCCs blocking inhibits osteoblasts proliferation under simulated microgravity condition.
3. Simulated microgravity up-regulates Cav1.2 mRNA and miR-103 expression. A miR-103 inhibitor partially counteracts the decrease in Cav1.2 protein level and LTCC currents density induced by simulated microgravity. MiR-103 inhibits osteoblasts proliferation in response to simulated microgravity, and the inhibitory effects of miR-103 oligos on osteoblasts proliferation under simulated microgravity condition are completely blocked when co-transfected miR-103 mimic or inhibitor with Cav1.2 siRNA.

Conclusions

1. Simulated microgravity inhibits osteoblasts proliferation. Simulated microgravity suppresses the percentage of EdU positive osteoblasts, down-regulates of PCNA expression and inhibits osteoblasts viability. All these data reveal that simulated microgravity inhibits osteoblasts proliferation and lay the foundations for exploring the mechanisms.
2. Simulated microgravity substantially inhibits LTCCs in MC3T3-E1 osteoblast-like cells by suppressing Cav1.2 expression. And it may be a novel mechanism for the inhibitory effects of simulated microgravity on osteoblasts proliferation.
3. Simulated microgravity inhibits osteoblasts proliferation by the activation of miR-103/Cav1.2 signaling pathway. This work may provide a novel mechanism of microgravity-induced adverse effects on osteoblasts proliferation, offering a new avenue to further investigate microgravity-induced bone loss.

Key words: Simulated microgravity; Osteoblasts; Proliferation; LTCCs; miR-103

前 言

骨密度的保持和骨骼结构的发育依赖于机械力学刺激。研究表明，机械力学刺激在骨重塑过程中促进骨形成，然而长期制动或是失重环境下的去负荷状态可导致骨质丢失。失重环境暴露可引起航天员多个系统功能失调，其中最为严重的是非自限性骨质丢失，且目前尚无有效对抗措施，这极大地增加了骨折的危险^[1-3]。长时间的失重暴露减少骨生成，增加骨吸收。失重诱导的骨质丢失能够以骨密度每个月接近 2% 的速度下降，此种环境下一个月骨质丢失的量和绝经期妇女一年的骨质丢失量相当^[4]。失重暴露引起的骨质丢失已成为制约长期航天飞行任务的最主要因素之一。因此，对失重性骨质丢失的研究也成为航空航天医学领域的研究热点。

骨的形成和重塑需要多种细胞的协作，其中成骨细胞发挥了至关重要的作用。成骨细胞直接影响骨重建的全过程，它不仅调节骨的生成，还间接调节骨吸收功能，它的数量和功能变化直接影响多种骨骼疾病的发生、发展和预后。作为骨组织中最重要力学感受细胞和成骨效应细胞，它的功能及调节机制已成为研究的重中之重。已有实验结果提示，失重条件下成骨细胞功能降低，导致成骨细胞数量减少和活性降低，最终引起骨质丢失，但具体机制尚不完全清楚^[5-7]。

成骨细胞上的钙离子通道，特别是 LTCCs 能够选择性的通透 Ca^{2+} 进入细胞，是成骨细胞内 Ca^{2+} 稳态的主要调控因素^[8]。LTCCs 由孔道形成亚基 α_1 和辅助亚基 $\alpha_2\delta$ 和 β 组成，成骨细胞上 γ 亚基缺如^[9]。孔道形成亚基 α 决定了 LTCCs 的基本功能特性，它既有电压敏感的序列，也有二氢吡啶结合的序列。可认为 α 亚单位是产生通道活性的唯一亚单位，在其它亚单位缺失的情况下， α 仍然可以发挥作用。亚基 α 由 4 个相似构造的结构域组成 (I-IV)，每一个结构域有 6 段跨膜序列^[10]。目前为止，发现了 10 种 α_1 亚基，其中 Cav1.2 α_{1c} 亚基在成骨细胞上表达丰度最高，且是负责 Ca^{2+} 进入细胞的主要亚基^[8, 11]。

研究表明， Ca^{2+} 是成骨细胞的重要调节因子，而钙离子通道，特别是 LTCCs 在机械刺激诱导的成骨细胞增殖中发挥重要作用^[12]。一些证据表明，当 LTCCs 被激活时，骨密度增加伴随骨溶解减少^[13, 14]。应用特异性 LTCCs 阻断剂，维拉帕米或

nifedipine 作用于成骨细胞可以阻断机械刺激诱导的增殖^[15]。另有研究表明，机械刺激能够促进成骨细胞细胞外基质分泌增加，但应用特异性 LTCCs 阻断剂后此效应消失^[16]。所以 LTCCs 在成骨细胞增殖中发挥重要作用，且对力学信号敏感。

多种因素参与 LTCCs 的调控，研究表明，在 GABA 能抑制性神经元细胞中，淀粉样前体蛋白能够通过下调 Cav1.2 的表达抑制神经元细胞 LTCCs 的功能^[17]。还有报道指出，在心肌细胞中钙离子-钙离子调节蛋白依赖的蛋白激酶 II (CaMKII) 通过下调 Cav1.2 的表达抑制心肌细胞 LTCCs 的电活动^[18]。除此之外，还有其他因素可以调控 Cav1.2 的表达，例如，元素硒缺乏加重小鼠心肌细胞氧化应激水平，进而引起 Cav1.2 基因和蛋白水平的上调^[19]。有学者还发现，在 cAMP 处理 24 h 后细胞 Cav1.2 mRNA 和蛋白水平均增加^[20]。

在 LTCCs 的众多调控因素中，miRNAs 成为近年来的研究热点。miRNA 是一种由约 22 个核苷酸构成的单链非编码小 RNA，广泛分布于真核生物细胞中，表达具有时序性、高度的进化保守性和组织特异性等生物学特点^[21, 22]。miRNA 通过精细调控多种基因的表达而参与到真核细胞的多种生物学过程中。miRNA 通过与其靶 mRNA 的互补配对在转录后水平对基因表达量进行精细调控，miRNA 主要通过以下三种方式沉默靶 mRNA：将靶 mRNA 片段切断；通过减少 mRNA 多聚 A 尾的长度影响 mRNA 的稳定性和通过和 mRNA 结合从而干扰 mRNA 的翻译效率^[23, 24]。目前研究表明，在不同组织来源的细胞中多种 miRNA 参与到 Cav1.2 的表达调控，分别是 miR-1^[25, 26]，miR-137^[27]，miR-328^[28]，miR-145^[29]，miR-155^[30]和 miR-103^[31]。但是，在成骨细胞中 miRNA 参与调控 Cav1.2 的表达鲜有研究报道。

本课题采用 2D 回转器模拟细胞失重效应，首先验证了模拟失重对成骨细胞增殖能力的影响，其次观察了模拟失重环境下成骨细胞 LTCCs 的功能变化情况并探究相关机制，最后探索 miR-103/Cav1.2 信号通路在模拟失重环境下对成骨细胞增殖的调控作用。此项研究为失重对成骨细胞增殖的负性调控提供了实验依据，也为进一步研究失重性骨质丢失的细胞学机制提供了新方向。

文献回顾

一、成骨细胞模型的研究进展

骨的形成和重塑需要多种细胞的协作，其中成骨细胞发挥了至关重要的作用。成骨细胞不仅调节骨的矿化，还间接调节破骨细胞的骨吸收功能，它的数量和功能变化直接影响骨的生物学特性。

目前用于研究成骨细胞生物学特性的细胞模型多种多样，包括不同种属来源的原代细胞和永生化或是恶性肿瘤细胞系。但这类细胞的生物学特性和人成骨细胞间存在一定的差异。在选择某个成骨细胞模型实验之前，需要对其生物学特性进行合理评估，以增加实验结论的可靠性。例如，选用骨肉瘤细胞系取材方便，不受伦理问题的约束，且有着更好的再现性；而人原代细胞具有的优势显而易见，其生物学特性与在体的成骨细胞更为接近，所以在临床前及临床实验中应用更广。因此，本篇综述将讨论不同类型的成骨细胞，包括各种属来源的原代成骨细胞和细胞系，为体外实验选择合适的成骨细胞模型提供参考。

1 原代成骨细胞

1.1 人原代成骨细胞

与其他种属的原代细胞或者细胞系相比，人原代成骨细胞更为贴近临床真实状态。但人原代成骨细胞在分离出来之后将会保持其已经分化的表现型，即这类细胞将会在不同的细胞群之间表现出异质性，而异质性是由取材部位和样本年龄等因素不同引起^[32]。分离人原代成骨细胞的主要方法是：酶解法和组织培养法，但这些方法步骤较为繁琐，耗时较长，不容易获取目的细胞^[33]。一些研究报道，酶解法会对随后的体外实验有影响，具体表现为，以酶解法得到的细胞，比组织培养的细胞增殖快，但 ALP 活性要低一些^[34]。不仅如此，与成骨细胞表型变化相关的基因表达和蛋白合成也受到供者年龄的影响。目前为止，已经证明多种因素对人原代成骨细胞的生物学特性有影响，其中供者的性别、年龄、取材位置和取材方法的影响尤为突出。至于哪些影响因素应该作为细胞模型的纳入标准现在还没有统一的认识。

1.2 其他种属的原代成骨细胞

由于人原代成骨细胞获取困难且存在细胞表型的异质性，科学家们开始尝试从其他动物体上分离培养原代成骨细胞用于体外研究。与人原代成骨细胞相比，动物原代成骨细胞获取简便。动物样本可以更好的控制纳入标准，控制样本的年龄、性别、体重和取材位置等。但使用其他种属的原代成骨细胞有着明显的弊端，种属之间的差异可能会使得出的结论与使用人原代成骨细胞得出的结论不同^[35]。1994年，美国食品药品监督管理局批准使用大鼠的原代成骨细胞作为临床前和临床药物疗效评估模型，用以治疗和预防绝经后骨质疏松^[36]。考虑到大鼠骨骼样本容易获取且基因组序列已知，大鼠的原代成骨细胞被广泛用于研究激素对细胞表型的影响及评估高分子聚合物或生物材料骨性诱导和细胞毒性^[37]。1983年，Ecarot-Chartier等^[38]通过新生小鼠颅骨组织块培养的方式首次分离出小鼠原代成骨细胞。影响鼠原代成骨细胞表现型的主要是样本年龄和取材位置^[39]。其他种属的原代成骨细胞来自牛、羊和兔。与啮齿类动物相比，这些种属来源的细胞使用较少。

2 细胞系

与原代细胞相比，细胞系的优势有：无限传代、容易获取和表型的相对稳定性等。但是，有学者报道经过多次的传代之后，有些细胞系出现明显的表型异质性。而且不管是非转化或是转化的细胞系，都被固定在分化的某一阶段，没法反应正常成骨细胞全面的表型特征。不仅如此，恶性细胞系的增殖是非生理模式，其他细胞所具有的接触抑制等相关生物学特性被改变^[40]。即便如此，细胞系在成骨细胞模型中还是得到了广泛的使用。即便如此，细胞系在成骨细胞模型中还是得到了广泛的使用。最为常用的细胞系有：人源的 MG-63 细胞、大鼠源的 ROS 17/2 细胞和小鼠源的 MC3T3-E1 细胞。

2.1 人源细胞系

2.1.1 MG-63 细胞系

1977年 Billiau等^[41]在14岁男性左侧股骨末端的近皮质骨肉瘤中分离出这株细胞。MG-63增殖迅速，不存在接触抑制，这一点被利用来生产干扰素^[42]。MG-63细胞系不具有成熟的成骨细胞表型，关于MG-63分化和矿化特性的研究尚存在争议。Kumarasuriyar等人^[43]报道，MG-63可作为良好的分化和矿化模型。在培养15天之前，MG-63分泌的ALP活性增加，随后逐步降低为正常水平，但I型胶原（Type-I

collagen, COL-I) 的表达量在培养的第二周才增加。在培养的第 15 天和第 29 天分别检测出骨钙素 (Osteocalcin, OCN) 和骨粘连蛋白 (Osteonectin, ON) 的表达, 但是 Runt 相关转录因子 2 和骨桥蛋白 (Osteopontin, OPN) 直到培养的第 28 天才表达。Pierschbacher^[44]和 Saldana^[45]分别在 1988 年和 2011 年报道 MG-63 细胞系的 ALP 活性很低, 且不能够完成矿化。MG-63 对维生素 D₃ 和 PTH 的反应和人原代成骨细胞相似。MG-63 相关蛋白的分泌具有维生素 D₃ 刺激的时间和计量依赖性^[46]。有学者证明, MG-63 分泌的细胞外基质成分与人原代成骨细胞不同, MG-63 分泌白凝胶酶和金属蛋白酶组织抑制因子, 但是没有 COL-I $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 链的羧基端前肽^[44]。

2.1.2 SaOs-2 细胞系

1987 年 Rodan 等^[47] 从 11 岁的白人女性分离出 SaOs-2 细胞系并对其进行研究。此种细胞系具有成熟的成骨细胞表型, 碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 活性较其他骨肉瘤细胞系高得多。在培养的早期其 ALP 活性与人原代成骨细胞相似, 但是在相同条件培养 14 天之后, 其活性要高出人原代细胞 120 倍^[45]。由于 SaOs-2 细胞系合成分泌 ALP 的特点, 在培养时加入地塞米松和磷酸盐的量要适当减少。SaOs-2 细胞系分泌的 COL-I 与人来源的原代细胞类似, 但是 SaOs-2 细胞系分泌的赖氨酰基羟基化水平较高^[48]。SaOs-2 细胞系能够表达甲状旁腺激素 (Parathyroid hormone, PTH) 和维生素 D₃ 的受体^[49]。

2.1.3 hOB细胞系

即the adult human osteoblast-like cell line, hOB的建立是将SV40病毒的大小T抗原转染到68岁的一个正常女性的成骨细胞中。hOB分化良好, 能够对类固醇激素起反应, 非常接近成熟的成骨细胞表型。此细胞系能够转录出COL- I、OPN、TGF和白细胞介素-1 (IL-1), 且在维生素D₃作用后OCN和ALP的转录和翻译均增加。hOB上表达功能性的雌激素和雄激素受体, 但无PTH的受体^[50]。

2.1.4 hFOB细胞系

即the human fetal osteoblast cell line, 科学家将SV40病毒大T抗原的温度敏感突变体tsA58转染到自发流产胎儿组织分离得到的成骨细胞中, 从而建立了hFOB。hFOB1.19是这个细胞系中分泌ALP活性最高的克隆, 其ALP和OCN的分泌对维生素D₃存在剂量依赖性。分化的hFOB表达高水平的OPN、ON和COL- I。甲状旁腺激素可以使得hFOB的cAMP水平增加。另外, 在细胞汇合时hFOB可形成钙化结节^[51]。

2.1.5 CAL72细胞系

Rochet等人^[52]于1999年建立了一株新的人骨肉瘤细胞系，与之前已建立的所有骨肉瘤细胞系相比，其生物学特性及表型更加接近正常的成骨细胞。CAL72为研究成骨细胞在造血细胞生长分化中的作用提供了良好的模型。与其他骨肉瘤细胞相比，其呈现出单一细胞因子表达谱的特点，这与之前研究较为充分的MG-63和SaOs-2相比更加接近正常的成骨细胞，并且CAL72与前两个细胞系不同，不会抑制造血克隆的生成。

2.2 大鼠源细胞系

2.2.1 UMR 106细胞系

这株骨肉瘤细胞系于1976年由Martin等^[53]建立。UMR 106起源于由P³²诱导的恶性骨源性肉瘤。此细胞系能够分泌ALP、COL-I、前列腺素和胶原酶。不仅如此，UMR 106还表达有表皮生长因子、PTH和维生素D₃的受体，所以其可在这些因子的作用下完成矿化。UMR 106有2株亚克隆，UMR 106-01和UMR 106-06，就目前研究所知，这2株亚克隆的唯一区别在于UMR 106-06表达有降钙素受体^[54, 55]。

2.2.2 ROS 17/2 细胞系

此细胞系来源于ACI大鼠自发的肿瘤，经过多次皮下接种后形成的稳定细胞系。Majeska等^[56]致力于此细胞系的建立与研究，发现在PTH或维生素D₃作用下ROS 17/2表现出较强的腺苷酸环化酶和ALP活性。ROS 17/2.8为ROS 17/2的亚克隆，它在合适培养条件下可结构性的表达COL-I mRNA，并完成矿化^[57]。Noda等学者^[58]发现，在TGF作用下，ROS 17/2.8合成ALP、COL-I、ON和OPN增加，但OCN合成减少。

2.2.3 UMR 201细胞系

此细胞系是来自新生大鼠颅骨的非转化细胞系。UMR 201由Ng等人^[59]于1988年建立，它是非永生化的细胞系，其只能传代12次，具有前成骨细胞的表型特征。在加入促分化试剂之前，UMR 201检测不出ALP的表达，但在加入维甲酸之后，ALP合成量显著提高，并具有很高的活性。TNF、地塞米松和维生素D₃能够调节UMR 201对维甲酸的反应性^[60]。由于以上原因，UMR 201可作为祖细胞向成骨细胞方向分化的研究模型，也可用以研究体内激素和各种生长因子对成骨细胞分化的调节及其相关机制。

2.2.4 RCT细胞系

1986年Jat和Sharp^[61]将含有SV40大T抗原cDNA的逆转录病毒转染到从胚胎大鼠颅骨中分离的成骨细胞中，从而建立了RCT细胞系。RCT-1来自较早分离下来的胚胎大鼠颅骨成骨细胞，表现出成骨细胞特性，比如在维甲酸的作用下，表达出ALP、COL-I和对PTH敏感的腺苷酸环化酶。RCT-3则来自晚期分离下来的成骨细胞，它的特点是持续性表达除OCN以外的成骨细胞的各种标志。

2.3 小鼠源细胞系

2.3.1 KS-4细胞系

此细胞系是将c-Ha-ras-1基因导入分离的小鼠颅骨成骨细胞中获得的。其特点是在细胞汇合之后ALP活性很低，COL-I产量低，且PTH作用后cAMP生成量少。不仅在翻译水平，在转录水平上KS-4合成的COL-I、ON和骨蛋白多糖I mRNA均较少，但是OCN正常。更为重要的特点是在与脾细胞共培养时，KS-4可促进破骨细胞的生成^[62]。

2.3.2 MC3T3-E1 细胞系

1981年，Sudo H等人^[63]用新生小鼠颅骨建立了一株细胞系MC3T3-E1。它是应用非常广泛的小鼠源性前成骨细胞模型。从这株细胞系中，已经建立多种亚克隆，其中的5种，即亚克隆4、8、11、14和26在抗坏血酸和 β 甘油磷酸钠作用下能够完成矿化^[64]。这些亚克隆在培养过程中高表达骨涎蛋白和OCN的mRNA。这5种亚克隆中只有4和14亚克隆能够在矿化过程中生成胶原细胞外基质。而亚克隆4在培养状态下，从增殖阶段到结节形成阶段再到最后的矿化完成阶段和在体的膜内成骨的这一过程相似^[65]。

经3天的培养，MC3T3-E1即能够在体外增殖且分泌COL-I，与此同时，ALP的活性从培养的第3天开始增加直到第21天完成矿化为止，矿物质于第14天开始沉积^[66]。抗坏血酸和 β 甘油磷酸钠是MC3T3-E1完成矿化的前提条件，在缺乏此类诱导剂时，MC3T3-E1产生的ALP活性很低，没法完成正常的矿化^[67]。MC3T3-E1的分化受到多种因素的调节，包括培养基、血清、细胞因子和生长因子^[68]。在加入全营养的胎牛血清时，细胞在分化早期具备较强的增殖能力，且在增殖后期细胞ALP活性、mRNA和蛋白的合成均增加^[69]。虽然MC3T3-E1是一种细胞系，但是在多次传代后其增殖能力下降，传60代之后细胞出现不连续的细胞周期，将发生复制性衰

老^[70]。基于以上特性，MC3T3-E1 是研究成骨细胞增殖和骨骼重塑的良好细胞模型。

3 总结

正确的实验设计对于解决特定问题来说不可或缺，而选择合适的模型是其中重要一环。本篇综述具体比较了不同来源成骨细胞之间的异同。

根据前文总结，人原代成骨细胞适用于体外骨生理学研究的各个方面。因为不能完全控制细胞供体的纳入标准，供体相关因素在一定程度上会影响到分离得到的成骨细胞表型，所以在供者捐献细胞之前需要对其进行准入控制。其他种类的原代细胞，特别是大鼠原代细胞适用于骨再生和重建过程的研究。此细胞最大的优势在于与人原代成骨细胞相比取材具有更好的同质性，即可以做到对动物的年龄、性别和取材位置标准化的控制。

细胞系是更为同质性的细胞群体，用于某一特定阶段成骨细胞表型的研究。细胞系在早期评价药物的治疗效果和细胞的相容性上有着不可替代的作用。但是其并不能完全反映原代细胞的特性。综述中所列举的细胞系中，MC3T3-E1 替代人原代成骨细胞更为可靠，所以应用领域更广。但是种属之间的差异使得证明的结论推演到临床应用困难重重，所以由细胞系得出的结论还需经过多种细胞模型的检验。

最后需要指出的是还有很多其他因素会影响到体外培养细胞的状态。例如，培养基的类型、培养基中的添加剂和培养细胞的密度等都可能干扰结论。经过长时间的发展，成骨细胞体外培养已经有标准化的方法。虽然这种标准化不能完全反映在体细胞的自然状态，但是越来越多的学者致力于模拟细胞自然生长状态培养系统的建立。已有研究证实，与标准化的单层细胞培养相比，3D 环境促进成骨细胞的成骨过程^[71]。

二、成骨细胞上离子通道的研究进展

骨质疏松症（Osteoporosis, OP）是常发的代谢性骨骼疾病，骨质疏松症的病理特征为骨质含量显著减少，骨质脆性增加和骨骼的退行性变。OP所带来的危害已引起全世界的广泛关注，对OP的研究具有重要的理论和现实意义^[72]。

成骨细胞在成骨过程中扮演重要角色。成骨细胞能够调节骨骼再生，还能够通过影响破骨细胞从而调节骨骼的吸收，其数目的变化将直接影响骨质疏松症的发生

和预后。现已发现，成骨细胞上存在多种离子通道。这些离子通道不仅调节成骨细胞的分化和增殖等生理活动，还参与机械信号感知、传递及转导过程，进而影响成骨细胞的成骨功能。

成骨细胞上表达多种重要的离子通道：钠离子通道、氯离子通道、ATP门控离子通道、瞬时受体电位通道、牵拉激活的阳离子通道、缝隙连接、半通道和水通道等，其中钾离子通道和钙离子通道的研究最为深入。

1 钠离子通道

Na^+ 在细胞外液中广泛存在，和液体的渗透压关系最为密切，同时也是可兴奋组织上形成动作电位的主要起始因素。在非可兴奋细胞上，其功能知之甚少^[73]。目前，成骨细胞上主要记录到2种 Na^+ 通道，分别是电压敏感性钠离子通道（Voltage-sensitive sodium channels, Nav）和上皮钠离子通道（Epithelial sodium channel, ENaC）。

电压敏感性钠离子通道 Nav是高度糖基化的复合物。分子水平上，该通道由1个 α 亚基和2个 β 亚基组成， α 亚基分子量为260 kDa， β_1 亚基为36 kDa， β_2 为33 kDa。 α 亚基具有电压敏感性和离子选择性，而 β 亚基的作用还不清楚。但有实验证明， α 亚基和 β_1 亚基的结合可以决定 Na^+ 通道的电生理和药理学特性。近期研究表明， β_2 亚基的一个氨基酸尾部结构域包含一个免疫球蛋白样折叠，可能在 Na^+ 通道的表达和分布上起到调控作用^[74]。Nav在神经元和横纹肌细胞中高水平表达，负责动作电位的上升期。成骨细胞上也有Nav表达，所以可产生动作电位。但由于Nav在成骨细胞上表达的密度较传统的可兴奋细胞低的多，所以成骨细胞引出的动作电位和传统的可兴奋细胞之间存在差异，其功能未被完全阐明^[73,75]。药理学水平上，Nav对tetrodotoxin（TTX）和saxitoxin（STX）敏感，还可以根据被TTX阻断的最低浓度分为TTX敏感的和TTX抵抗的离子通道^[74]。

上皮钠离子通道 ENaC是一种非电压依赖性离子通道，是机械敏感性离子通道家族的重要成员^[76]。ENaC由三种不同亚单位构成，分别是 α 亚基、 β 亚基和 γ 亚基。三个构成通道的亚单位中，主要功能单位是 α 亚基，辅助单位是 β 亚基和 γ 亚基^[77]。ENaC可通透质子和阳离子，特别是 Na^+ ，在感知酸过多、保持钠离子稳态和传导机械刺激方面有着重要的作用^[78]。ENaC也是细胞间相互通讯的基本途径之一，负责调控细胞内外 Na^+ 转运，从而维持体内 Na^+ 平衡^[79]。 Na^+ 可以直接通过对成骨细胞的分化来干预成骨功能，表现为低浓度的 Na^+ 能够有效促进成骨细胞的分化，而高浓度的 Na^+

却显著抑制成骨细胞的分化^[80]。ENaC也是许多药物作用的靶点，并逐渐成为OP研究的新领域。ENaC可被阿米洛利特异性阻断，主要受到性激素、胞内Ca²⁺、Na⁺、pH值和G蛋白调节，且对糖皮质激素敏感^[78]。

2 氯离子通道

Cl⁻和Na⁺一起，主要是负责调节细胞容积的变化。在成骨细胞中，细胞容积的变化可影响细胞感知微环境的能力。Cl⁻还可调节pH、细胞容量稳定、有机溶剂的转运和细胞迁徙增殖和分化^[81]。在成骨细胞上已记录到4种Cl⁻通道电活动，即电压门控性氯离子通道（Voltage-gated chloride channels, CICs）、容积敏感性氯离子通道（Volume-sensitive chloride channels）、钾氯共转运体（Potassium-chloride cotransporter, KCC）和细胞内氯离子通道（Chloride intracellular channels, CLIC）。

电压门控性氯离子通道 CICs分布于细胞质膜或是细胞内膜连接处。根据功能的相似性，CICs可以分为3个分支。第一分支编码质膜分子，包括CIC-1和CIC-2；第二分支包括CIC-3、CIC-4和CIC-5，定位在细胞内的囊包系统内；第三分支包括CIC-6和CIC-7，主要定位在细胞内膜上。CICs可反向转运Cl⁻或H⁺和Cl⁻，从而调控细胞的兴奋性、跨膜运输、离子稳态、细胞内物质运输和囊泡酸化。研究证明CICs，特别是CIC-3，对CICs的分化和细胞外基质矿化起作用^[82]。

容积敏感性氯离子通道 细胞外液渗透压的降低可引起细胞膨胀，从而会产生对细胞膜的机械牵张。这种外向整流的Cl⁻电流可由渗透膨胀和细胞外K⁺的增加引出，用于调节由细胞低渗性膨胀引起的容量变化^[83]。

钾氯共转运体 KCC调节细胞容量的关键分子除容量敏感性氯离子通道外还有KCC^[84]。等渗的KCl溶液可激活KCC，其激活可看作是离子通道活动的扳机。KCC可缓冲细胞外K⁺浓度的变化，保持细胞外K⁺稳态，这一过程在骨折愈合中起作用^[85]。

细胞内氯离子通道 CLIC是近年来在成骨细胞上发现的一种新型Cl⁻通道，其家族有7个成员，主要定位于细胞核的核膜和细胞器膜上。虽然证明这些蛋白可在细胞质膜上形成阴离子通道，但其功能一直存在争议^[86]。

3 ATP 门控离子通道（ATP-gated ion channels）

在骨组织中，ATP是细胞外最重要的调节分子之一。通过P2受体，ATP可以调节骨组织生物活动的各个方面，包括生长，发育和修复等^[87]。

根据受体转导信号方式的不同，P2受体可以分为两个家族，代谢型受体家族P2Y

和离子型受体家族P2X，前者是G蛋白偶联受体；而后者为配体门控的离子通道。因此ATP门控的离子通道实际上是P2X受体，但P2X和P2Y具有相互调节作用。成骨细胞上P2X的作用主要是调节细胞因子的释放，并作用于破骨细胞调节成骨细胞凋亡的开启^[88, 89]。

4 瞬时受体电位通道 (transient receptor potential channels, TRP)

TRP通道蛋白包含有6次穿膜的结构域，组成同质或异质的四聚体，形成有活性的通道。所有TRP都是阳离子通道，其对一价和二价阳离子的通透性根据其离子通道的亚型不同而不同^[90]。

根据氨基酸的同质性，TRP可以分为7个家族：TRPC、TRPM、TRPV、TRPML、TRPP、TRPA 和TRPN^[91, 92]。TRP家族中TRPC (1-7)、TRPV (1-6)、TRPM (1、2、3、6、7和8)、TRPA1、TRPP (2、3和5) 和TRPML (1、2和3) 都是Ca²⁺通道，但是其Ca²⁺通透性差异很大，只有TRPV5和TRPV6是唯一已知的Ca²⁺高选择性通道^[93]。

多种因素能够调节TRP通道的开放，这些因素有渗透压、细胞内信号分子、pH值、内源性配体和机械牵张^[94]。

另外，在成骨细胞上发现一类Mg²⁺通道，后来证明是TRPM7，此通道保证了胞内Mg²⁺稳态从而维持细胞的基本生命活动^[95]。

5 牵拉激活的阳离子通道 (stretch-activated cation channels, SA)

SA 是 1989 由 Duncan 和 Misler 首次在成骨细胞上发现^[96]，其特殊性在于此通透链接在细胞骨架上。当成骨细胞受到机械刺激时，SA 会被激活，产生一些骨质重塑因子，此通道是生长促进激素作用的靶点之一。研究证明，PTH 促进此通道的功能，Gd³⁺是其特异性阻断剂。

在 SA 中研究较为深入的是牵拉激活的钙离子通道，在体外当对成骨细胞进行拉伸时，细胞可经历一个即刻的、极短的 Ca²⁺水平升高，这种 Ca²⁺水平升高起始于细胞内 Ca²⁺的释放，随之伴有 Ca²⁺的内流^[97]。

6 缝隙连接 (gap junction)

是由序列和结构相似的连接蛋白 (connexins, Cx) 家族组成的穿膜通道，6 个 Cx 单体以头对头的形式形成连接相邻细胞细胞质的细胞间孔道^[98]。在哺乳动物中鉴定和克隆了接近 20 种连接蛋白，但是只有 3 种在成骨细胞上表达，分别为 Cx43、Cx45 和 Cx46。缝隙连接只允许小于 1 kDa 的分子通过，例如小的代谢产物、离子和

细胞内的信号分子^[99, 100]。

缝隙连接在成骨细胞之间，成骨细胞和破骨细胞之间与成骨细胞和骨细胞之间起到信号传递的作用。缝隙连接细胞间通讯(Gap junction intercellular communication, GJIC)已经被证明在成骨细胞分化和骨形成的过程中起到调节作用。不仅如此，缝隙连接可直接在破骨细胞上发挥作用，或是通过成骨细胞间接调节破骨细胞的形成，生长和凋亡等活动^[101]。

缝隙连接的功能和表达受到激素和其他信号分子的调节，比如PTH可以促进缝隙连接蛋白在成骨细胞上的表达。同样，在前列腺素E2作用下，GJIC和连接蛋白的表达也会增加，但未发现雌激素和活性维生素D对成骨细胞上的缝隙连接有作用^[102]。

7 半通道(hemichannel)

同样由Cx构成的半通道定位在细胞表面，功能独立于缝隙连接。与缝隙连接相似，通透选择性较低，允许分子量小于1 kDa的分子通过^[103]。一项原子力显微镜扫描结果表明，组成半通道的Cx缺少贯通脂质双分子层的结构，所以与缝隙连接不同，半通道调节的是细胞与细胞外基质通讯，而不是调节细胞间的通讯^[104]。半通道在成骨细胞中的作用是双磷酸盐化合物分解代谢作用的传感器，调节成骨细胞在机械应力作用时前列腺素的迅速释放。

缝隙连接和半通道均有机感受作用，在细胞间与细胞和细胞外基质间由机械刺激引起的信号传递有着必不可少的特殊作用，并进一步促进骨质形成和重塑，但半通道的生理学作用大部分是未知的。

半通道受电压、蛋白激酶C、细胞外Ca²⁺和维甲酸的调节，例如，细胞外Ca²⁺浓度降低会促进半通道的开放^[105]。

8 水通道

水和渗透物质穿过细胞膜是由水通道蛋白(Aquaporin, AQP)调控的^[106]。据报道，AQP家族至少包括了12个整合膜蛋白(AQP0-AQP11)，同源性较高，其中AQP2和AQP3的研究较为充分，功能较为重要。AQP可以对水选择性的通透，也可以通透像甘油和尿素这样的小渗透物质^[107]。由AQP组成的通道使细胞膜对水分子有高通透性，因此允许水分子顺着渗透梯度流动。作为细胞膜上的重要位点，用来控制液体的摄入与分泌。

AQP2在人体组织细胞上的表达分布很窄，而AQP3在人体上皮和非上皮组织上

广泛表达。在成骨细胞上没有检测到AQP2的表达，但检测出AQP3的表达，其主要分布是关节软骨深层的成骨细胞^[108]。

9 钾离子通道

K^+ 是细胞内的重要离子，有很高的电化学活性。在成骨细胞的收缩过程的起始阶段起作用。其在成骨细胞的线粒体上也有分布，并且和细胞的凋亡关系密切^[5]。依据拓扑结构，成骨细胞上 K^+ 通道可划分为3大类，分别为电压依赖性钾离子通道（Voltage-dependent potassium channels），内向整流钾离子通道（Inwardly rectifying potassium channels, Kir）和双孔钾离子通道（Two-pore domain potassium channel, 2PK⁺）。

9.1 电压依赖性钾离子通道

具有6个跨膜段和1个孔区的 K^+ 通道亚型。成骨细胞上表达的电压依赖性钾离子通道主要有以下4种。

9.1.1 电压门控性钾离子通道（Voltage-gated potassium channels, Kv）

由4个孔道形成亚基 α 和4个辅助亚基 β 组成， α 亚基有6个穿膜结构域。其主要负责细胞膜的复极化^[109]。

9.1.2 大电导钙激活钾离子通道（Large-conductance calcium activated potassium channels, BK）

由 α 和 β 亚单位组成。其中， α 亚单位组成孔道， β 亚单位可调节通道的电学和药理学特点。

BK属于机械敏感性通道，因其在成骨细胞上高表达和可在膜牵张时开放，能够使机械牵张转变成为胞内反应，可将其看作是骨组织的机械感受器^[110]。BK参与许多胞内活动，比如细胞容积的调节，控制细胞的粘附，在机械负荷下调节细胞膜电位，调节细胞因子释放和细胞迁徙等^[111, 112]，并参与细胞形态的保持^[113]。此外，成骨细胞上BK还可快速持续地反馈调节细胞膜去极化^[114]。BK可被奎尼丁、粉防己碱和四乙胺阻断，被异松脂酸、甲状旁腺素和前列腺素E2激活，表现为 Ca^{2+} 和电压依赖^[115]。BK通道的活性还受到动态聚合状态或解离状态肌动蛋白等细胞骨架的影响^[110]。

9.1.3 中电导钙激活钾离子通道（Intermediate-conductance calcium activated potassium channels, IK）

与BK相似，在成骨细胞上广泛表达，而且有着相似的电生理性质。即使在ATP

足够的情况下，BK调控细胞膜电位的作用也较小；相反，IK可在激动剂的作用下促进Ca²⁺的移动，从而调控细胞膜电位。ATP介导的细胞内Ca²⁺浓度增加主要是激活IK，引起细胞膜的超极化。IK通道表现为Ca²⁺依赖，可被环磷酸胺阻断^[116]。

9.1.4 瞬时外向钾离子通道 (Transient outward potassium channels)

电流在去极化刺激时被引出，表现出激活快，失活慢的特点^[117]。细胞膜的去极化和细胞内Ca²⁺的浓度增加都可激活此通道，从而缓冲胞内Ca²⁺浓度。瞬时外向钾离子通道在成骨细胞中Ca²⁺信号转导机制起到重要作用，由于它的存在，细胞内Ca²⁺增加是暂时的^[118]。

9.2 内向整流钾离子通道

具有2个跨膜段和1个孔区，这2个跨膜结构域形成了孔道。Kir是由4个 α 亚基组成的同聚体或异聚体^[75]。

Kir负责当膜电位小于K⁺平衡电位时内向转运K⁺，从而使电流进入细胞比出细胞更容易。这种内向电流伴随着细胞外K⁺浓度的增加而增加。它还可增加K⁺膜电导，有效的控制膜电位接近K⁺的平衡电位。值得注意的是Kir虽具有整流作用，但无电压依赖性^[119]。

Kir的门控特性不仅受到膜电位的影响也受到细胞外K⁺浓度的调节^[118]。其典型特点是可被细胞外Ba²⁺可逆性阻断。

9.3 双孔钾离子通道

此通道是20世纪90年代发现的具有4个跨膜段和2个孔区的K⁺通道亚型。由于该通道无电压依赖性，可在静息电位时开放，故也被称为背景K⁺通道或漏流通道^[110, 119]。

2PK⁺的表达分布非常广泛，与细胞增殖和细胞膜静息电位的密切关系。在成骨细胞中与在神经系统中的作用相似，调节静息电位和细胞电兴奋性。2PK⁺对机械作用敏感，与电压门控和Ca²⁺激活的K⁺通道配合，使细胞膜的复极化速率与机械作用的影响相偶联。2PK⁺还可作为机械信号转导下游通路信号^[119]。2PK⁺对细胞膜的牵张、pH、温度等因素敏感，而对于传统K⁺通道阻断剂不敏感，但又能被前列腺素和cAMP阻断^[120]。

除此以外，最近还发现一类特殊的K⁺通道—EAG (Ether-a-go-go related) 通道。传统观点认为K⁺通道通过控制膜电位，调节K⁺内流从而促进细胞的增殖，但EAG通

道能够抑制细胞的增殖^[121]。 K^+ 通道对成骨细胞的数量、形态和矿化等能力的影响是复杂的，在调节成骨细胞的生理活动中扮演了极为重要的角色。

10 钙离子通道

Ca^{2+} 在成骨细胞中发挥了至关重要的作用。 Ca^{2+} 的增加可来自细胞外也可来自细胞内钙库释放。细胞内的钙库在成骨细胞是指内质网。为了了解成骨细胞中的 Ca^{2+} 稳态，要区分一个重要的概念，信号 Ca^{2+} 和无机 Ca^{2+} 。在细胞外的矿化作用中，无机 Ca^{2+} 作为细胞内其他信号通路的下游被调控，和羟基磷灰石晶体一同沉积在蛋白质支架上。在第二信使作用中，信号 Ca^{2+} 在激活细胞反应中起到基础作用。作为主要的细胞内离子， Ca^{2+} 已经被证明和细胞内的许多功能相关，但更重要的是， Ca^{2+} 信号的微小变化可以在细胞中产生不同的信号通路，从而产生不同的作用。任何原因任何形式的细胞内 Ca^{2+} 长时程的增多都会引起细胞的死亡或凋亡^[73]。当前成骨细胞膜片钳的研究主要集中在以下2大类 Ca^{2+} 通道。

10.1 电压敏感性钙离子通道（Voltage-sensitive calcium channels, VSCC）

VSCC 是蛋白质复合体，可调节 Ca^{2+} 内流等生理功能。根据通道的动力学和药理学特性，可以将 VSCC 超家族分为 5 个亚群：L、T、P、N 和 Q。其中 L 型是细胞中发现分布最广研究最透彻的 Ca^{2+} 通道，其次是 T 型，而 P、N 和 Q 型少有报道^[10, 122, 123]。

VSCC 是异质二聚体，由 4 个亚单位组成，分别是 α_1 、 α_2 、 β 和 δ ^[8, 9]。 α 亚单位组成通道的孔道，这个亚单位由 4 个跨膜结构域组成，每个结构域又是由 6 穿膜结构组成^[124]。 α 亚单位既有电压敏感的序列，也有二氢吡啶结合的序列。可认为 α 亚单位是产生通道活性的唯一亚单位，在其它亚单位缺失的情况下， α 仍然可以发挥作用，但此时膜电流密度变低，电压激活更加缓慢^[10, 125]。分子克隆证明 VSCC 具有非常大的多态性， α 亚基就由至少 3 个基因调控。亚基 α 由 4 个相似构造的结构域组成（I-IV），每一个结构域有 6 段跨膜序列。目前为止，发现了 10 种 α_1 亚基，其中 Cav1.2 亚基在成骨细胞上表达丰度最高，且是负责 Ca^{2+} 进入细胞的主要亚基。根据 α_1 亚基药理学和生理学功能的不同，VSCC 可以分为以下两类，高电压激活型{L（Cav1.1-1.4）、P/Q（Cav2.1）、N（Cav2.2）和 R（Cav2.3）亚型}和低电压激活型{T（Cav3.1-3.3）亚型}^[126]。低电压激活的通道和高电压激活的通道在蛋白质水平序列的相似性小于 25%，并且在功能特性上有着显著的差异^[8]。其它辅助亚基，特别是 β

亚基, 调节 VSCC 的门控特性和控制通道的装配和运输。 β 亚基可促进 VSCC 的正确折叠, 并帮助其在细胞膜上定位。研究发现 β 亚基与和细胞膜链接的鸟苷酸激酶蛋白结构相似^[127-129]。 β 亚基通过许多不同蛋白质的相互作用影响细胞间的信号转导。成骨细胞上有三种 β 亚基, 其中 β_2 亚基的密度最大, 并起到主要作用^[130]。 δ 亚基的分子量有 24 kDa 和 27 kDa 两种。

成骨细胞上表达的 VSCC 是可兴奋细胞上的特征性通道, 但又很难引起钙诱导的钙释放现象 (CICR), 而 CICR 又是绝大多数可兴奋细胞的重要特征^[131]。成骨细胞上 VSCC 表达与一般可兴奋细胞的最大不同在于其表达的数量要少得多。比如, 成熟的横纹肌细胞上 VSCC 的数量是成骨细胞数十倍, VSCC 数量上的不同也体现在 mRNA 水平^[132]。推测成骨细胞可根据其功能需要的不同, 表达出数量介于可兴奋细胞和不可兴奋细胞之间的 VSCC。其功能是随着激素和机械刺激的影响, 调节多种细胞外基质蛋白的分泌^[133, 134]。VSCC 在成骨细胞乃至骨骼系统的生理作用中起到核心作用。

L 型 VSCC 在细胞体外培养 7-8 天后才能被检测出来, 在 1-2 周时活性达到峰值。但如果用无血清的培养基来培养成骨细胞, L 型的活性可更早出现。然而, T 型在培养 2-4 天后就可检出, 而且活性在 8 天后就减低或消失^[135]。由此产生一个假设, T 型在细胞分化的早期发挥作用, 而 L 型和分化一直相关。L 型是高电压激活且电流持续时间长, 可被二氢吡啶特异性阻断。而 T 型能够在微小去极化的情况下被激活且很快失活, T 型对二氢吡啶不敏感但可被 Ni^{2+} 阻断, 此为 T 型通道的主要特征^[136]。

胞膜去极化、 VD_3 、PTH 和表皮生长因子可调节成骨细胞上 VSCC 的功能。VSCC 的功能是根据 Ca^{2+} 进入细胞的时空方式不同而改变。而 Ca^{2+} 进入细胞的时空方式不同主要是因为细胞膜上表达不同亚型的 VSCC, 每种亚型都具有不同的激活和失活动力学特征、药理学特征和组织的分布特征^[11]。

10.2 配基门控性钙离子通道 (Ligand-gated calcium channels)

代谢型谷氨酸受体和离子型谷氨酸受体在成骨细胞上功能性表达。离子型谷氨酸受体作为谷氨酸门控型离子通道, 它的激活可引起 Ca^{2+} 内流。而代谢型谷氨酸受体可和 G 蛋白偶联, 进而激活磷脂酶 C 合成二酰甘油和三磷酸盐, 或被动的与腺核苷酸环化酶结合^[137]。

离子型受体根据激活受体的配体不同, 可以将其分为 N-methyl-D-aspartate

(NMDA), a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) 和 Kainate (KA) 等不同型别, 研究主要集中在 NMDA 上^[137, 138]。

成骨细胞上离子型受体的激活引起细胞膜去极化和 Ca^{2+} 内流, 进而增加谷氨酸释放和激活第二信号通路, 同时也会影响成骨细胞表型。离子型谷氨酸受体的阻断会使骨质合成减少, 减缓成骨细胞的分化, 降低骨基质蛋白的翻译, 说明谷氨酸信号的调控可促进骨质形成^[139]。

正文

第一部分 模拟失重抑制 MC3T3-E1 前成骨细胞的增殖

随着世界范围内航天工程的快速发展，长时程的失重暴露引起的医学问题得到了越来越多的关注。长时间的失重环境暴露对航天员全身多个系统产生不利影响，严重威胁航天员的身心健康。多年研究发现，经过物理训练和药物治疗等一系列综合措施可在一定程度上解决失重暴露对航天员的不利影响，但目前仍无有效的措施对抗失重性骨质丢失^[1-3, 6]。随着失重暴露时间的延长，骨质丢失逐渐加重且无自限性，这已成为制约长期航天飞行任务的最主要因素之一。因此，对失重性骨质丢失的研究成为相关领域的研究热点。

成骨细胞能够调节骨骼再生，还能够通过影响破骨细胞从而调节骨骼的吸收，其数目的变化将直接影响骨质疏松症的发生和预后。作为骨组织中最重要力学感受细胞和成骨效应细胞，成骨细胞的功能及调节机制得到了科学家们越来越多的关注。已有实验结果提示，失重条件下成骨细胞功能降低，导致成骨细胞数量减少和活性降低，最终引起骨质丢失，但具体机制尚不完全清楚^[6, 7]。

此实验部分采用 Edu 阳性率、PCNA 含量和 CCK-8 等指标检测了模拟失重环境对小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 增殖的影响，明确了模拟失重抑制成骨细胞增殖这个实验现象，为后续机制探讨部分实验奠定了基础。

1 材料

1.1 实验细胞

小鼠前成骨细胞系 MC3T3-E1 购自美国细胞库 ATCC。

1.2 实验器材

—80℃ 冰箱	Forma 公司
多功能高压蒸汽灭菌锅	TOMY 公司
FZSW-BB15 CO ₂ 培养箱	Heraeus 公司
枪头和 EP 管	Axygen 公司
厚滤纸	Whatman 公司
培养皿、6 孔板、96 孔板和培养瓶	美国 CORNING 公司
小型高速离心机	美国 SBP 公司
4℃ 冷冻离心机	美国 SBP 公司
PVDF 膜	美国 Pierce 公司
电泳仪	美国 Invitrogen 公司
UV-2600 紫外分光光度计	美国 UNIC 公司
数码凝胶图像处理系统	上海天能公司
2D 回转器	中国航天员科研训练中心
SW-CJ-ZF 型净化工作台	苏州净化集团安泰公司
涡旋振荡器	北京六一仪器厂
WD-9405B 型水平脱色摇床	北京六一仪器厂
电磁搅拌器	北京晨曦盛世有限公司
塑料薄膜封口机	北京晨曦盛世有限公司
202 型电热恒温干燥箱	北京科伟永兴仪器有限公司
伯乐 680 酶标仪	上海普林斯顿生物有限公司
DKB 超级恒温水浴箱	上海精宏实验设备有限公司

1.3 实验试剂

胰蛋白酶	HyClone 公司
DMEM 培养基	HyClone 公司
胎牛血清	HyClone 公司

双抗	HyClone 公司
PCNA 抗体	Cell Signaling Technology 公司
辣根酶 (HRP) 标记羊抗小鼠 IgG	ProteinTech 公司
Cell Counting Kit-8 (CCK-8 试剂盒)	日本同仁公司
ECL 发光液	美国 Pierce 公司
Prestained Protein Ladder	美国 Fermentas 公司
SDS-蛋白凝胶试剂盒	美国 Invitrogen 公司
SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液	美国 Invitrogen 公司
Tween-20	上海碧云天生物技术研究所以
一抗稀释液	上海碧云天生物技术研究所以
EDT	上海碧云天生物技术研究所以
丽春红	上海碧云天生物技术研究所以
一抗二抗去除液体	上海碧云天生物技术研究所以
考马斯亮蓝	上海碧云天生物技术研究所以
甲醇	上海国药集团化学试剂有限公司
多聚甲醛	上海国药集团化学试剂有限公司
PBS	西安科昊生物有限公司
GAPDH 抗体	北京康为世纪生物技术有限公司 (CW0101A)

2 方法

2.1 细胞培养

小鼠 MC3T3-E1 细胞用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养,培养基内添加 1%的双抗。细胞在 37℃、5 % CO₂ 恒温孵箱中培养, 3 天传代一次。全部细胞学实验使用的细胞均为 8-12 代。

2.2 2 D 回转器模拟细胞失重效应

- 1) 常规培养 MC3T3-E1 细胞。首先，以适宜密度接种 MC3T3-E1 至 2.2×2.2 cm 的高压灭菌的玻璃片上，常规培养待细胞完全贴壁；
- 2) 待 MC3T3-E1 完成贴壁且细胞密度合适时，我们把特制的玻片固定在特制的回转支架上，接着把回转舱灌满常规培养基，随后密封回转舱；
- 3) 设置水平回转组（处理组）和垂直回转组（对照组），将整个回转装置放在水浴培养箱中，调节转速为 24 rpm；
- 4) 48 h 回转结束后将玻璃片上的细胞消化下来留作后续实验。

2.3 EdU 检测细胞增殖

按照广东锐博公司 EdU 增殖检测试剂盒说明书操作。

2.4 CCK-8 法检测细胞增殖

按照日本同仁公司 CCK-8 细胞活性检测试剂盒说明书操作。

2.5 蛋白质的提取和浓度测定

- 1) 将回转器玻璃片取出放在 6 孔板里，用预冷的 PBS 清洗玻璃片 3 次，弃净残留液体；
- 2) 每孔加入裂解液 50 μ l，用刮刀将玻璃片上的细胞刮下；
- 3) 收集裂解液于 EP 管中，低温震荡 30 min；
- 4) 将上述 EP 管以 15,000 g 低温离心，持续 15 min，小心吸取上清移入新 EP 管中。4℃ 保存，长时间保存，放置在 -20℃。
- 5) 按合适的比例配置蛋白浓度检测反应液，在反应液中加入适量的蛋白液，用以进行检测；
- 6) 吸加到 5 ml EP 管里加入 2 ml BCA 工作液，后加入 5 μ l 蛋白提取液和 115 μ l 双蒸水，37℃ 水浴孵育 30 min；
- 7) 30 min 恒温孵育后，利用分光光度计检测反应液在 562 nm 处的吸光度值；

- 8) 将各组吸光度值分别代入标准曲线中, 计算各组样品蛋白浓度(标准曲线制作步骤详见 BCA 试剂说明书)。

2.6 免疫印迹实验 (Western blotting)

- 1) 将上述蛋白样品加入适量的 loading buffer 煮沸 10 min, 制作电泳蛋白样品, 长期保存, 放置在 -20°C 中;
- 2) 在进行凝胶电泳时, 以 90 V 电压先进行电泳, 保持 30 min 后改电压为 120 V, 90 min 后电泳结束;
- 3) 在电泳进行中, 为转膜做准备, 在甲醇里将 6×8 cm 的 PVDF 膜浸润 30 s, 然后将其他转膜器具在甲醇中完成 10 min 浸泡;
- 4) 待电泳完成后, 组装转膜器具进行转膜, 条件设为: 250 mA 恒流保持 2 h, 关闭电源;
- 5) 配制浓度为 5% 的封闭液, 合理剪裁 PVDF 膜, 室温摇床封闭 5 h;
- 6) 随后把 PVDF 膜用滤纸吸干后放入用一抗稀释液稀释的一抗中, 4°C 摇床过夜, 随后将 PVDF 膜放在 TBST 中漂洗 6 次, 每次 5 min, 摇床为 80 rpm, 洗去一抗;
- 7) 将 PVDF 膜放入加有用 TBST 配制的二抗孵育液中, 室温摇床上放置 2 h, 然后用 TBST 漂洗 6 次, 每次 5 min, 洗去残留二抗;
- 8) 按照合适比例配制 ECL 发光液, 随后进行发光。

2.7 统计分析

实验数据采用均数 \pm 标准差表示, 利用 SPSS 19.0 软件先对数据进行正态性分析和方差齐性检验, 当进行两样本间比较时采用独立 t 检验; 当进行不同时间点多次测量的样本分析时采用重复测量方差分析 (Repeated-Measures ANOVA), 组间比较采用 Bonferroni post hoc 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 模拟失重降低成骨细胞 EdU 染色阳性率

EdU 是一种新型的胸腺嘧啶核苷类似物, 用于检测 DNA 合成活性, 直接反映细胞的增殖能力。在 2D 回转器模拟失重 48 h 后, 取出玻璃片按照实验步骤进行 EdU 染色。如图 1-1 所示, 模拟失重组的成骨细胞 EdU 染色阳性率显著降低 ($P < 0.05$)。

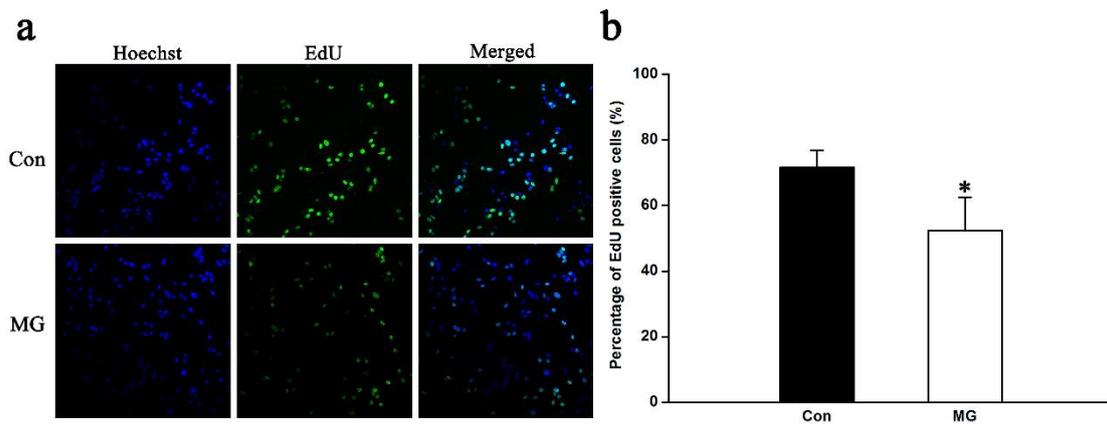


图 1-1 模拟失重降低 MC3T3-E1 细胞 EdU 染色阳性率

Figure 1-1. Simulated microgravity (MG) inhibits the percentage of EdU positive cells. (a) EdU incorporation assay was analyzed by confocal microscopy. Proliferating MC3T3-E1 cells were labeled with EdU. Staining of MC3T3-E1 cells with the nucleic acid dye Hoechst (blue) and EdU (green), respectively. (b) Histogram showing average data for the percentage of EdU positive cells from the two groups. The EdU incorporation rate was expressed as the ratio of EdU positive cells to total Hoechst positive cells ($n = 3$). The results were expressed as the mean \pm s.d. with two-tailed Student's t test against control samples. * $P < 0.05$ compared with stationary control.

3.2 模拟失重降低成骨细胞 PCNA 的表达

作为 DNA 聚合酶 δ 的协同因子, PCNA 在 DNA 的合成和复制中发挥核心作用, 它是调控细胞进入 S 期的关键因素, 它的表达在 G1 期开始增高, 在 S 期达到峰值。所以 PCNA 被认为是一个重要的细胞增殖生物标记物。如图 1-2 所示, 与对照组相

比，回转组的 PCNA 表达量显著降低 ($P < 0.05$)。

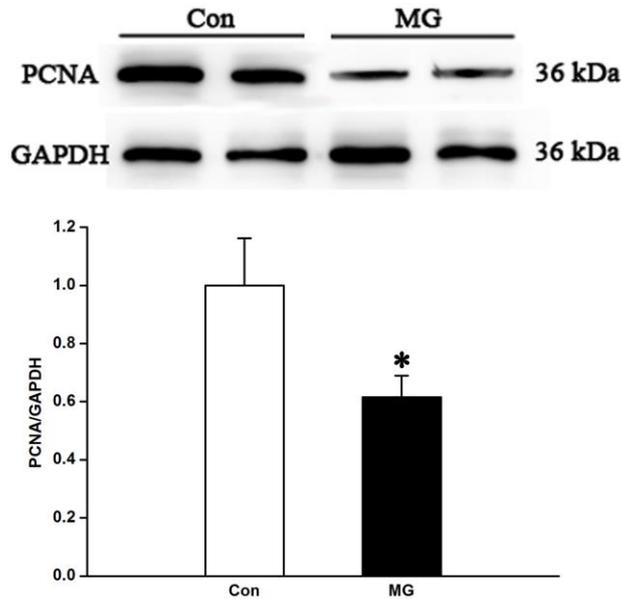


图 1-2 模拟失重降低 MC3T3-E1 细胞 PCNA 的表达

Figure 1-2. Protein levels of PCNA in osteoblasts under simulated microgravity condition. Western blot analyzes the expression of PCNA in the cells under simulated microgravity condition. The total protein loaded per lane was 40 μ g; detection of GAPDH on the same blots was used to verify equal loading amongst the various lanes (upper). Histogram showing average data for the relative expression of PCNA present in the cells from each group quantified by camera-based detection of emitted chemiluminescence (lower) ($n = 3$). The results were expressed as the mean \pm s.d. with two-tailed Student's t test against control samples. * $P < 0.05$ compared with stationary control.

3.3 模拟失重抑制成骨细胞的活性

为了进一步观察模拟失重对成骨细胞增殖的影响，我们应用 CCK-8 法检测回转后 MC3T3-E1 细胞的活性。图 1-3 表明模拟失重后的细胞活性与对照组相比显著减弱，且在停止回转 96 h 内两组细胞间的活性差异仍具有显著意义 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

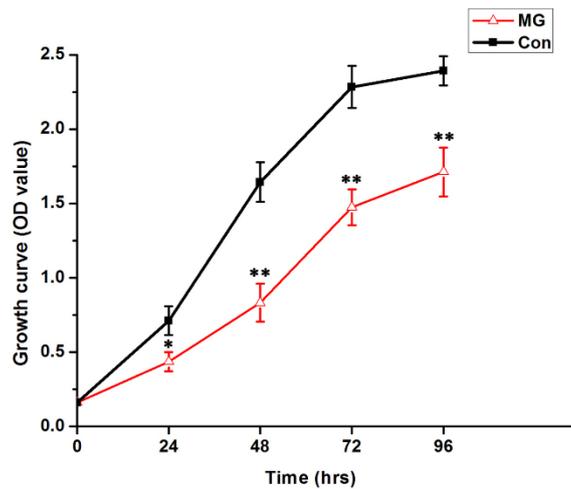


图 1-3 模拟失重降低 MC3T3-E1 细胞活性

Figure 1-3. Simulated microgravity inhibits osteoblasts viability. Comparison of changes of cell viability between control and MG group. The cells were seeded on 96-well plates at a density of 2,000 cells/well. Cell proliferation was evaluated by a WST-8 assay at 24-96 h (n = 3). The results were expressed as the mean \pm s.d. with two-tailed Student's *t* test against control samples. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, compared with stationary control.

4 讨论

大量研究表明航天飞行中的失重环境对航天员的身心健康可产生多种不利影响，其中失重性骨质丢失呈现逐渐加重且无自限性的特点，严重影响长期航天事业的发展。成骨细胞能够感受外界力学信号，且发挥主要的成骨功能，它的功能状态将决定人体骨量。现有实验表明，失重环境降低成骨细胞功能，造成成骨细胞活性降低且数量减少，影响骨形成，最终导致骨质丢失，但具体机制尚不完全清楚^[6, 7]。

本实验应用Edu阳性率、PCNA含量和CCK-8等指标检测了模拟失重环境对小鼠前成骨细胞MC3T3-E1增殖的影响。结果表明，模拟失重降低成骨细胞EdU染色阳性率、抑制成骨细胞PCNA蛋白的表达和细胞活性，从多个角度明确了模拟失重对成骨细胞增殖的抑制作用。本实验的研究结果和国内外已有结果基本一致。本课题组之前报道，MG-63细胞经回转器模拟失重处理后细胞贴壁面积明显减小，细胞生长受到抑制^[140]。失重环境中下MC3T3-E1细胞数量明显减少，说明失重抑制成骨细胞的增殖^[141]。另有实验证明模拟失重抑制骨骼肌细胞和血管内皮细胞的增殖^[141, 142]。在航

航天员或者是在轨飞行大鼠模型中，研究人员已经观察到失重可引起骨骼系统的变化，比如骨密度的降低、矿化方式的改变和细胞外基质表达减少等^[143, 144]。据报道，严重的失重性骨质丢失可以到达一个月之内骨密度下降2%，这与绝经期妇女一年的骨质丢失量相等^[4]。研究表明，成骨细胞增殖能力的减弱是失重性骨质丢失的重要原因。

实验本身存在一定的不足。首先，我们采用的地面模拟失重设备为回转器，值得注意的是，虽然 2D 回转器可以模拟失重，但仍不能等同于真实的失重条件。因为真实环境下进行细胞学实验的机会相对较少，因此地面模拟器研究成为了对真实失重状态研究的有力补充。2D 回转器作为有效的模拟失重的实验手段，使科研人员能够在地面开展细胞在模拟失重条件下的变化特征及规律的研究，从而经济高效地探索失重的生物学效应^[145]。其次，我们只是在小鼠的前成骨细胞系 MC3T3-E1 中验证了模拟失重对细胞增殖的影响。虽然 MC3T3-E1 在增殖方面和人原代细胞有着很多相似性，但是我们还可在其他种属的细胞系、原代细胞甚至在体模型中进一步验证模拟失重对成骨细胞增殖的影响。最后，成骨细胞的增殖、分化和矿化作为成骨细胞成骨的主要指标，增殖、分化和矿化是成骨细胞独立的生物学过程，但又相互作用和影响，我们可在进一步的研究中将增殖、分化和矿化作为一个完整的成骨指标进行观察。

本实验明确了模拟失重对成骨细胞增殖的抑制作用，为我们进一步研究现象机制奠定了基础。

第二部分 模拟失重抑制 MC3T3-E1 前成骨细胞上 L 型钙离子通道的功能

第一部分的研究发现，模拟失重降低成骨细胞 EdU 染色阳性率、抑制成骨细胞 PCNA 蛋白的表达和细胞活性，从多个角度明确了模拟失重对成骨细胞增殖的抑制作用，但具体机制尚不完全清楚。而近期研究发现，LTCCs 在成骨细胞增殖的调控中发挥重要作用。

LTCCs 选择性的通透 Ca^{2+} 进入细胞，是成骨细胞内 Ca^{2+} 稳态的主要调控因素。LTCCs 由孔道形成亚基 α_1 和辅助亚基 $\alpha_2\delta$ 和 β 组成，成骨细胞上 γ 亚基缺如。孔道形成亚基 α_1 决定了 LTCCs 的基本功能特性，其由 4 个相似构造的结构域组成(I-IV)，每一个结构域有 6 段跨膜序列。目前为止，发现了 10 种 α_1 亚基，其中 Cav1.2 α_{1c} 亚基在成骨细胞上表达丰度最高，且是负责 Ca^{2+} 进入细胞的主要亚基^[8,9,11]。

研究发现，LTCCs 尤其是 Cav1.2 LTCCs 在机械刺激诱导的成骨细胞增殖中发挥重要作用。一些证据表明，当 LTCCs 被激活时，骨密度增加伴随骨溶解减少^[13,14]。应用特异性 LTCCs 阻断剂，维拉帕米或 nifedipine 作用于成骨细胞可抑制机械刺激诱导的成骨细胞增殖^[15]。另有研究表明，机械刺激能够促进成骨细胞细胞外基质分泌增加，但是应用特异性 LTCCs 阻断剂后此效应消失^[16]。

综上所述，LTCCs 在成骨细胞增殖中发挥重要作用，且对力学信号敏感。但是，对于失重能否影响成骨细胞 LTCCs 功能及其可能的调控机制尚无报道。本实验部分主要应用 Calcium imaging 和膜片钳技术检测模拟失重条件下成骨细胞 LTCCs 的功能变化，并应用 qPCR、Western blotting 和免疫荧光等方法对可能的机制进行探讨。

1 材料

1.1 实验细胞（同第一部分）

1.2 主要器材（其余相同）

玻璃微电极	上海脑研究所
微电极控制仪 PP-83	日本 Narishige 公司
膜片钳放大器 CEZ-2300	日本 Nihon Kohden 公司

1.3 主要试剂（其余同前）

Bay K8644	Alomone Labs公司
nifedipine	Alomone Labs公司
抗Cav1.2一抗	Alomone Labs公司
Lipofectamine 2000	美国Invitrogen公司
Opti-MEM低血清培养基	美国Invitrogen公司
Fluo-3-AM	上海碧云天生物技术研究所
无水氯化钙	上海国药集团化学试剂有限公司
siRNA-Cav1.2	上海吉玛公司
siRNA-NC	上海吉玛公司

2 方法

2.1 细胞培养（同第一部分）

2.2 2 D 回转器模拟细胞失重效应（同第一部分）

2.3 Calcium imaging

- 1) 取处理后的细胞，以每孔 5×10^5 细胞接种于激光共聚焦专用培养皿内，培养至贴壁；

- 2) 用HBSS缓冲液洗涤细胞3次, 加入5 μM 的Fluo-3-AM后, 细胞在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 恒温孵箱中培养40 min;
- 3) 用HBSS缓冲液洗涤细胞3次, 洗去多余的Fluo-3-AM后, 再在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 恒温孵箱中培养10 min;
- 4) 激光共聚焦显微镜观察细胞形态, 激发波长为488 nm, 吸收波长为525 nm, 图像采集设置为1秒1张, 持续1 min;
- 5) 当记录到稳定的基准细胞内 Ca^{2+} 水平后, 将细胞外的HBSS缓冲液换成含有高钾的HBSS缓冲液, 此液体用将KCl的浓度提高到55 mM且将NaCl的浓度降低为70 mM, 高钾的HBSS缓冲液中同时还加入10 mM Bay K8644;
- 6) 图像分析应用Bio-Rad Comos和共聚焦专用图像分析软件, 荧光强度的变化用荧光强度变化百分率(R)来均一化, 计算公式为 $R = [(F_{\max} - F_0) / F_0] \times 100\%$, 这里的 F_0 为加入高钾HBSS缓冲液之前记录到的平均荧光强度, F_{\max} 为加入10 mM Bay K8644后记录到的平均荧光强度。

2.4 全细胞模式记录 MC3T3-E1 细胞 LTCCs 电活动

- 1) 使用日本Narishige的垂直微电极控制仪PP-83控制玻璃微电极;
- 2) 在控制好的玻璃微电极内注入电极内液, 选择液接电阻为2-6 $\text{M}\Omega$ 的微电极继续试验; 电极内液配方为(mM) 150 CsCl、5 EGTA、10 HEPES、5 Na₂ATP和10 D-glucose, pH用CsOH调整到7.2, Cs⁺是为了减少外向的K⁺电流;
- 3) 准备两种细胞外液体, 外液A和外液B, 其配方分别是外液A (mM): 120 NaCl、30 mannitol、3 K₂HPO₄、1 MgSO₄、30 HEPES、0.1% BSA和0.5% glucose, pH用NaOH调整到7.4; 外液B (mM): 108 BaCl₂和10 HEPES, pH用Ba(OH)₂调整到7.6, Ba²⁺用来代替Ca²⁺, 作为电荷载体去增加二价离子电流;
- 4) 玻璃微电极接触细胞外液A后, 手动补偿失调电位到基线水平, 慢慢调节针尖接近贴壁较好的细胞, 给负压完成封接至封接电阻达到2 $\text{G}\Omega$ 时, 补偿快电容后, 待封接电阻稳定后负压吸引破膜;
- 5) 破膜后, 等待封接电阻再次稳定在2 $\text{G}\Omega$ 或以上时, 控制钳制电压为-80 mV, 同时给5 mV的除极刺激脉冲, 用以测定全细胞电容;

- 6) 在补偿串联电阻和串联电容后记录电流，LTCCs电流的记录程序为：控制钳制电压为-80 mV，再去极化至-40 mV，并维持200 ms，钠通道和T型电压依赖的钙通道失活；阶跃10 mV，并逐步去极化至60 mV，维持400 ms；LTCCs电流幅值以内向峰值电流与末端除极电流之差计算得到，各电流峰值电流除以该细胞膜电容得到电流密度 (pA/pF)，软件绘制不同钳制电压下计算得出的电流密度曲线即 I-V 曲线。

2.5 免疫印迹实验 (Western blotting) (同第一部分)

2.6 Cav1.2 siRNA 的转染和干扰效率的评价

- 1) 根据 NCBI 中小鼠 Cav1.2 (CACNA1C) GenBank 编号 (NM_009781)，委托吉玛制药技术有限公司设计合成出 3 条 Cav1.2 的 siRNA，同时合成无关干扰 siRNA 阴性对照；
- 2) 将常规培养 MC3T3-E1 细胞接种于 6 孔板内，待细胞汇合度在达到 70%-80%后，换用 Opti-MEM 培养液预先培养细胞 2 h；
- 3) 吸 250 μ l Opti-MEM 培养液于 EP 管中，加入 5 μ l Lipofectamine 2000 充分混匀，常温静置 5 min；
- 4) 吸取 5 μ l Cav1.2 siRNA 溶液及阴性对照无序的 RNA 溶液，分别再加入 250 μ l Opti-MEM 培养液充分稀释，轻柔吹打，使其混匀；
- 5) 将 3) 和 4) 中所配置的溶液混合，轻柔吹打，室温静置 20 min，使 Lipofectamine 2000 能够充分包裹 siRNA，形成稳定的复合物；
- 6) 弃去培养皿内待转染孔中的培养液，加入 5) 中配置的溶液 1 ml 常规培养，轻轻摇动细胞培养皿使其充分混匀，置入 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的培养箱重培养；
- 7) 转染 6 h 后将吸取培养液，换为无双抗 10% 血清的常规培养液，待 48 h 后行 Western blotting 检测 Cav1.2 表达量；
- 8) 最终筛选出沉默效率最好的 Cav1.2 siRNA 序列 (Cacna1c-mus-2942)，用于后续实验，次序列为：

Cav1.2 siRNA 序列为：

Sense 5'- GUGCCACCGUAUUGUCAAUTT -3'

Anti-sense 5'-AUUGACAAUACGGUGGCACTT-3'

无序对照序列如下，经 Blast 分析无同源序列：

Sense 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'

Anti-sense 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

2.7 EdU 检测细胞增殖（同第一部分）

2.8 CCK-8 法检测细胞增殖（同第一部分）

2.9 统计分析

所有数据以均数±标准差表示，采用 SPSS 19.0 软件先对数据进行正态性分析和方差齐性检验，当进行两样本间比较时采用独立 *t* 检验；当进行同一样本多次测量的多样本分析时采用重复测量方差分析（Repeated-Measures ANOVA），组间比较采用 Bonferroni post hoc 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 模拟失重抑制 Bay k8644 诱导的成骨细胞内钙离子浓度增高

Bay K8644 是 LTCCs 特异性的激动剂，可以在细胞膜除极化状态下迅速特异性的开放 LTCCs。在 2D 回转器模拟失重 48 h 后，取出玻璃片按照 Calcium imaging 实验操作步骤观察处理后的细胞 LTCCs 功能是否发生变化。对照组细胞的荧光强度在加入 10 μ M Bay K8644 的 1 s 轻度增加（图 2-1c 和 d）。对照组和回转组细胞的荧光强度变化率（ $R = [(F_{\max} - F_0) / F_0] \times 100\%$ ）分别是 2.48 ± 0.52 和 1.57 ± 0.23 ，差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ，图 2-1e）。对照组和回转组分别有 $75.3\% \pm 9.7\%$ 和 $80.7 \pm 4.6\%$ 的细胞在加入 Bay K8644 后细胞内钙离子浓度发生变化，此差异没有统计学意义（图 2-1f）。

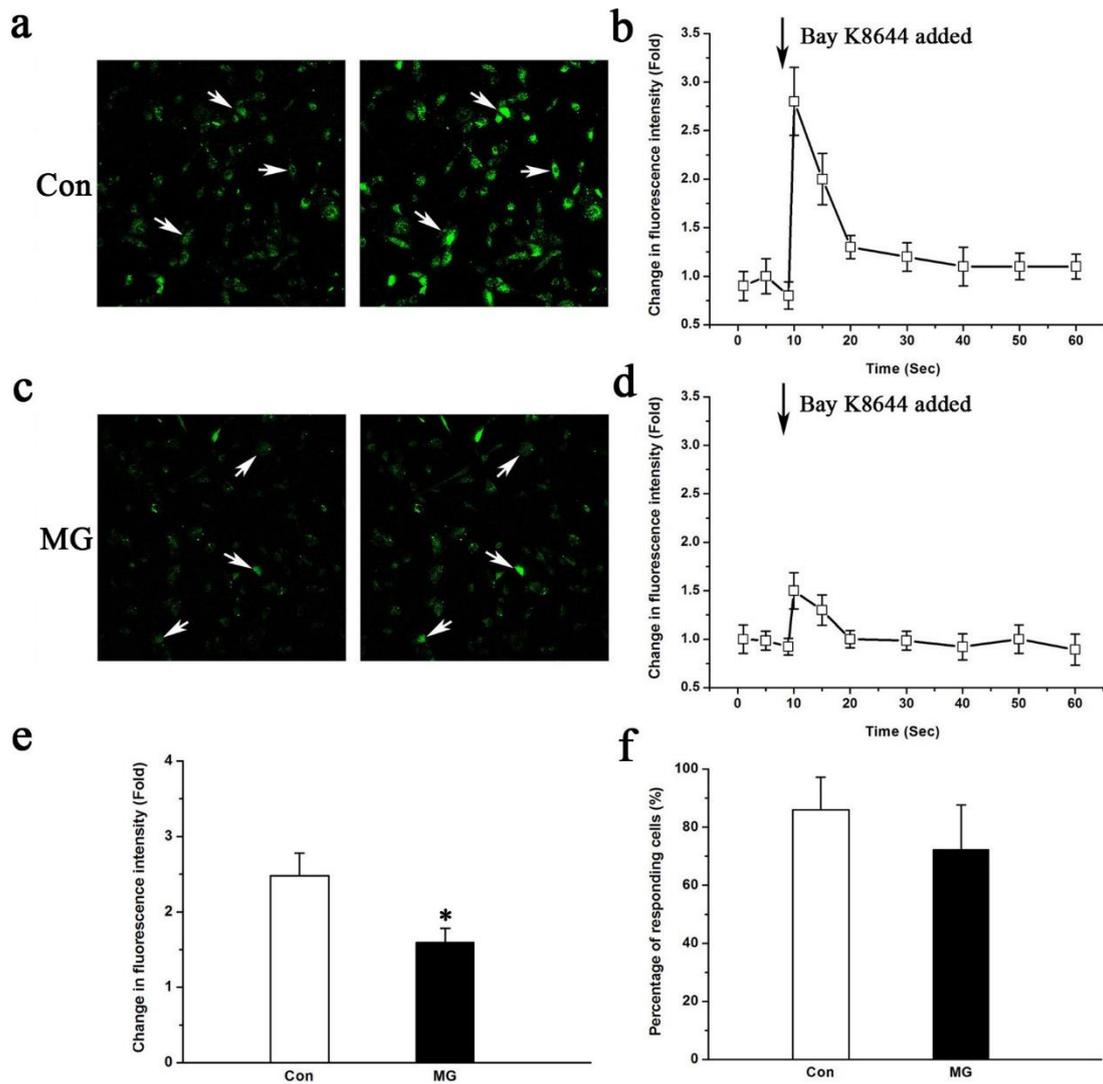


图 2-1 模拟失重对 Bay k8644 诱导的成骨细胞内钙离子浓度增加的影响

Figure 2-1 Effects of simulated microgravity on changes in $[Ca^{2+}]_i$ induced by Bay K8644. (a) Effect of Bay K8644 on $[Ca^{2+}]_i$ in control cells: *left*, a representative picture of $[Ca^{2+}]_i$; *right*, a representative picture of $[Ca^{2+}]_i$ for cells treated with Bay K8644; twenty cells were measured in each experiment. (b) A representative curve of $[Ca^{2+}]_i$ changes in MC3T3-E1 cells treated with Bay K8644. (c) Effect of Bay K8644 on $[Ca^{2+}]_i$ in cells of the simulated microgravity group: *left*, a representative picture of $[Ca^{2+}]_i$; *right*, a representative picture of $[Ca^{2+}]_i$ for cells treated with Bay K8644; twenty cells were measured in each experiment. (d) A representative curve of $[Ca^{2+}]_i$ changes induced by Bay K8644 in cells of the simulated microgravity group. (e) Difference in $[Ca^{2+}]_i$ with Bay K8644 treatment in control and simulated microgravity-pretreated cells ($n = 4$, $\alpha = 0.05$,

* $P = 0.022$). (f) Differences in the percentage of cells responding to Bay K8644 between the control and simulated microgravity groups ($n = 4$, $\alpha = 0.05$, $P = 0.076$). Each group shown is from four experiments with a cumulative analysis of 80 cells total. Bars represent the mean \pm s.d. with two-tailed Student's t -test against control samples.

3.2 模拟失重抑制成骨细胞上 LTCCs 的电活动

为了进一步验证模拟失重对成骨细胞LTCCs的影响,我们应用膜片钳技术检测在这种无负荷状态下LTCCs的电活动变化。图2-2a记录到的是典型的全细胞模式下对照组成骨细胞LTCCs的电活动,图2-2b记录到的是回转组细胞的情况。图2-2a和b表明,无论Bay K8644是否作用,模拟失重后成骨细胞LTCCs的电流均减弱;对照组和处理组都是在+10 mV时记录到峰值内向电流;在加入10 μ M Bay K8644后LTCCs内向电流的幅度增高了2倍左右,而在加入1 μ M nifedipine后内向电流几乎被完全抑制了;这些数据表明我们记录的内向电流是由LTCCs电活动产生的。

因为细胞的大小会影响到内向电流的幅值,而细胞膜电容(C_m)可以作为一个间接的衡量细胞大小的参数,所以我们采用 C_m 作为标准来表示归一化记录到的内向电流大小,以pA/pF为单位。图2-2c和d表明,回转组细胞在有无Bay K8644激活下,在所有刺激钳制电压下,其内向电流均较对照组减小。图2-2e显示,与对照组相比,回转组细胞的电流密度明显减小;对照组和回转组在+10 mV时记录到的平均峰值电流密度分别是 -3.52 ± 0.48 pA/pF和 -2.41 ± 0.38 pA/pF ($P < 0.05$, 图2-2e)。应用10 μ M Bay K8644后,在+10 mV时记录到的最大内向电流密度增大1.5倍左右;对照组和回转组在的平均峰值电流密度分别是 -5.43 ± 0.49 pA/pF和 -3.24 ± 0.32 pA/pF ($P < 0.05$, 图2-2f)。膜片钳结果再次证明,模拟失重抑制成骨细胞上LTCCs功能。

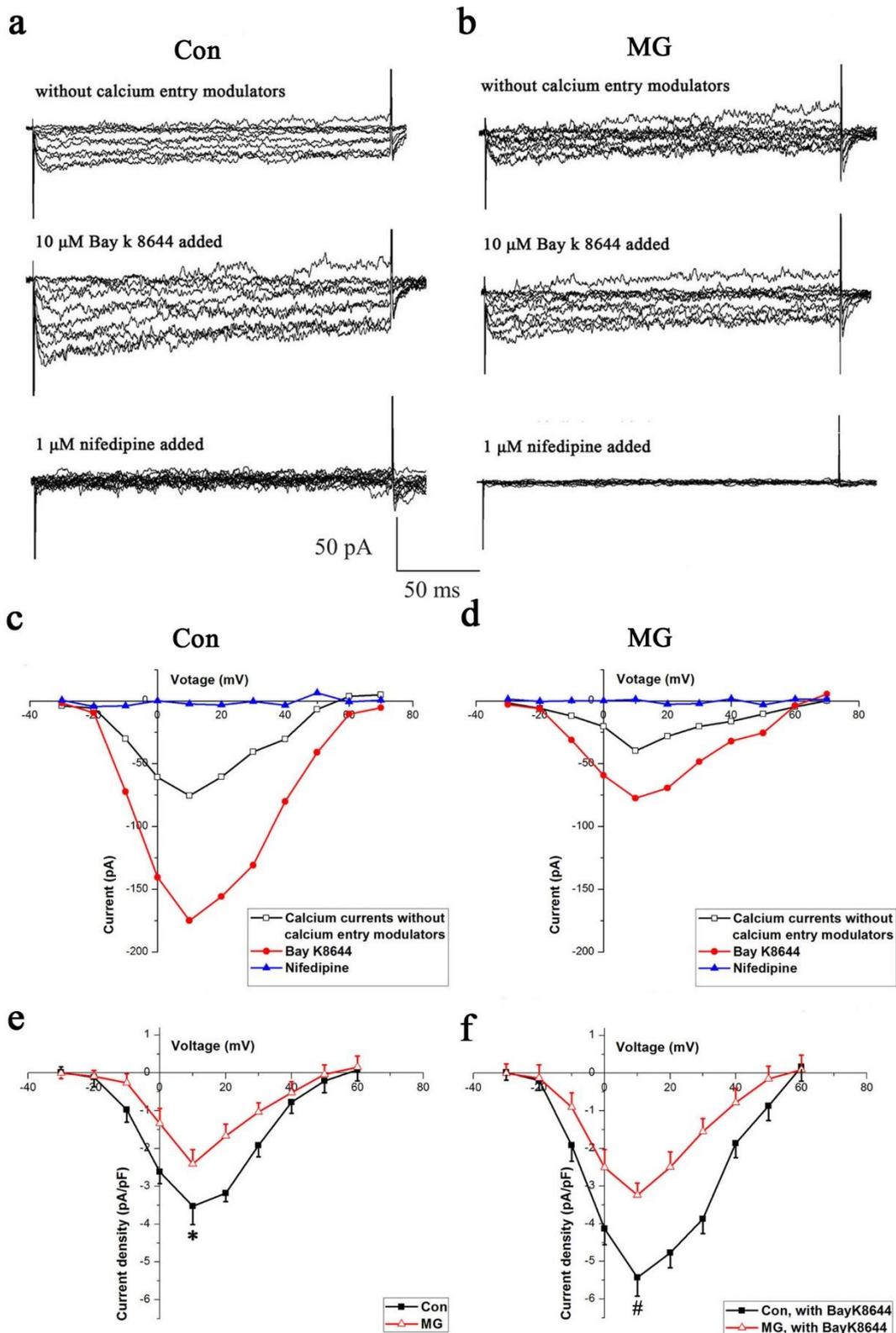


图 2-2 模拟失重对成骨细胞 LTCCs 电活动的影响

Figure 2-2 LTCC currents in MC3T3-E1 from Con and MG groups. (a) and (b) Representative families of inward currents were recorded without Ca^{2+} entry modulators

(*upper*) and in the presence of Bay K8644 (*middle*) or nifedipine (*lower*) from a holding potential of -40 mV for a Con cell and for a MG MC3T3-E1 cell. (c) and (d) I-V curves for a single cell under each condition. (e) and (f) Comparison of changes in LTCC current densities between Con ($n = 16$ cells) and MG cells ($n = 13$ cells), regardless of whether the LTCCs were activated by Bay K8644 ($\alpha = 0.05$, $*P = 0.018$, $\#P = 0.007$). The values are the mean \pm s.d., and statistically significant differences were determined using a one-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test.

3.3 模拟失重下调成骨细胞 Cav1.2 蛋白的表达

上述实验已经证明模拟失重抑制成骨细胞上LTCCs的功能，而成骨细胞的LTCCs由孔道形成亚基 α_1 和辅助亚基 $\alpha_2\delta$ 和 β 组成，且目前发现的10种 α_1 亚基中Cav1.2 (α_{1c} 亚基)在成骨细胞上表达丰度最高，是负责 Ca^{2+} 进入细胞的主要亚基，模拟失重是否通过影响Cav1.2的表达从而抑制LTCCs的功能，目前未见研究报道。为此，我们将开展了一下实验。

首先，应用免疫细胞化学的方法检测在回转条件下成骨细胞Cav1.2的表达和分布变化。图2-3显示了回转前后MC3T3-E1中Cav1.2免疫荧光染色的情况，对照组细胞Cav1.2在细胞内大量分布，以细胞膜为甚（图2-3b和c）；而回转后Cav1.2表达减少，且细胞膜上Cav1.2减少的更为明显（图2-3e和f）。为了验证荧光染色的特异性，不加抗Cav1.2的一抗，只孵育Fluor-488标记的二抗，结果如图2-3g所示；为进一步验证一抗的特异性，在孵育一抗的同时将Cav1.2一抗竞争性结合肽段与细胞一同孵育，结果如图2-3h所示。

为了进一步验证回转后Cav1.2的表达变化，我们应用Western blotting技术检测Cav1.2的蛋白水平。图2-4是对照组和回转组Cav1.2的表达情况，与对照组相比，回转组Cav1.2的表达降低了50%左右 ($P < 0.05$)。

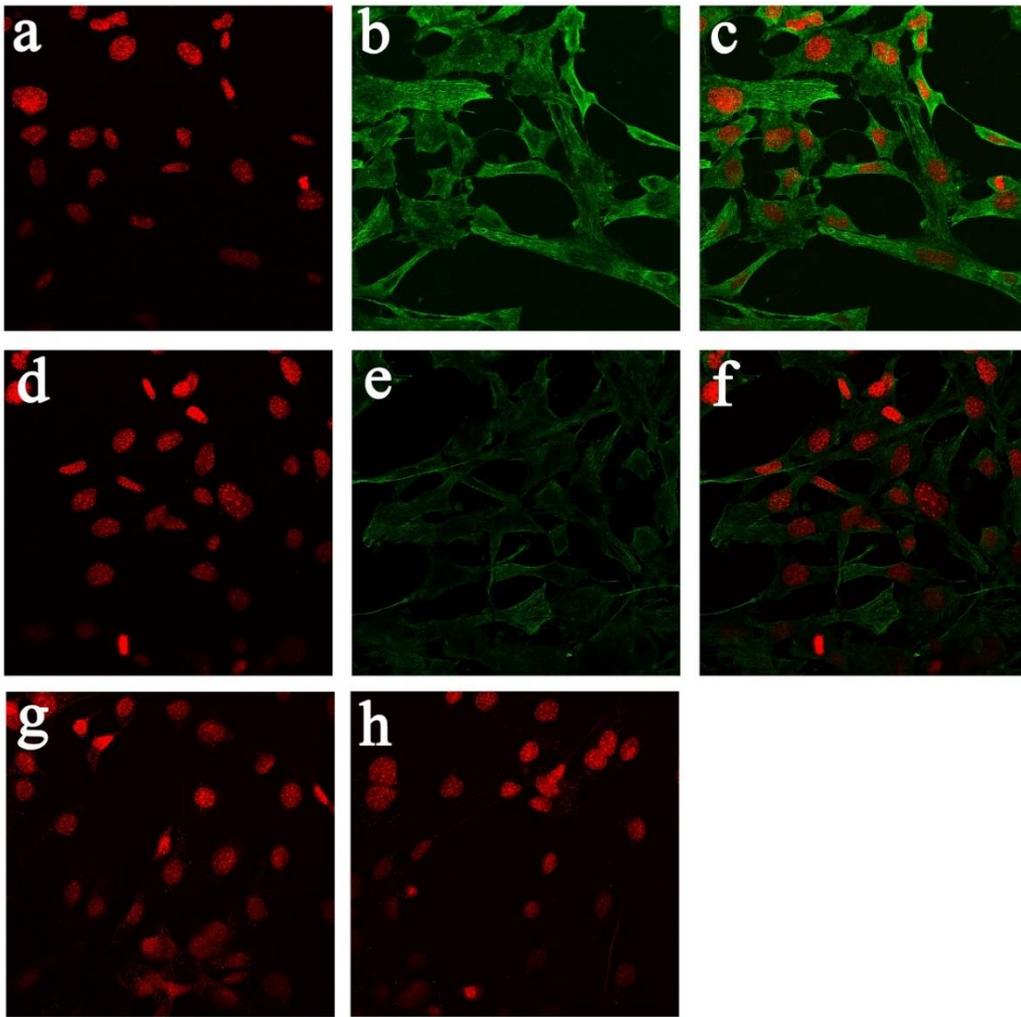


图 2-3 模拟失重条件下成骨细胞 Cav1.2 的免疫细胞化学染色

Figure 2-3 Immunocytochemistry of Cav1.2 LTCC in MC3T3-E1 cells in response to 48 h under simulated microgravity conditions. (a), (b) and (c) Staining of MC3T3-E1 cells under normal gravity conditions with the nucleic acid dye ToPro3 (a), rabbit anti-Cav1.2 antibodies (b), (a) and (b) merged (c), with Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG as the secondary antibody. (d), (e) and (f) Simulated microgravity-treated MC3T3-E1 cells stained with the nucleic acid dye ToPro3 (d), rabbit anti-Cav1.2 antibodies (e), (d) and (e) merged (f), with Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG as the secondary antibody. (g) MC3T3-E1 cells incubated with competing peptides for anti-Cav1.2. Cultures incubated with the competing peptide displayed slight green staining and comparable levels of nuclear staining. (h) MC3T3-E1 cells incubated with Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody in the absence of primary antibody.

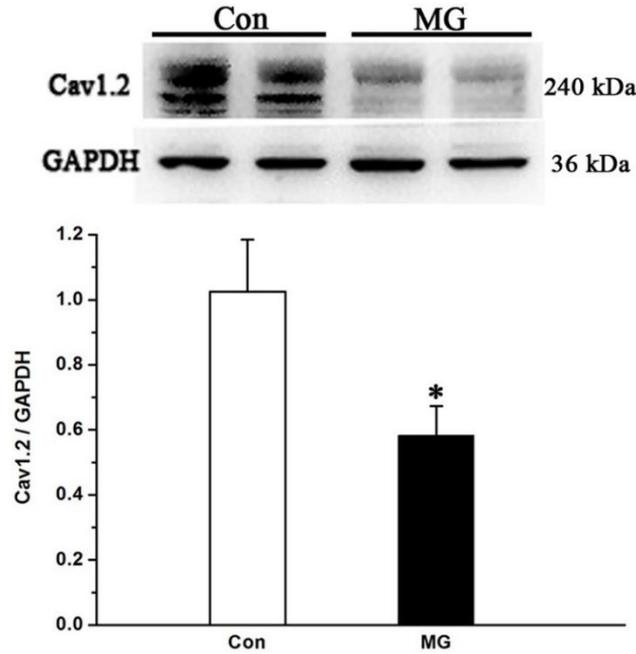


图 2-4 模拟失重条件下成骨细胞 Cav1.2 蛋白水平变化

Figure 2-4 Changes in the Cav1.2 subunit protein levels in MC3T3-E1 cells under simulated microgravity conditions. Western blot analysis of Cav1.2 expression from cell lysates from MC3T3-E1 under normal gravity and simulated microgravity conditions. The total protein loaded per lane was 40 μ g; GAPDH detection on the same blots was used to verify equal loading among the various lanes (*upper*). Histogram showing the average data for the relative expression of Cav1.2 present in the cells from the Con and MG groups, which was quantified by the camera-based detection of emitted chemiluminescence (*lower*) ($n = 4$, $\alpha = 0.05$, $*P = 0.019$). Bars represent the mean \pm s.d. with two-tailed Student's *t*-test against control samples.

我们应用Western blotting技术验证构建的Cav1.2 siRNA的沉默效率，如图2-5a所示，在转染siRNA的48 h后，siRNA组的Cav1.2表达量降低了约60%，且有效沉默作用至少持续72 h ($P < 0.05$)。随后我们在转染Cav1.2 siRNA的48 h后，应用膜片钳技术检测LTCCs的功能变化，图2-5b和c表明，siRNA组细胞在有无Bay K8644激活下，在所有刺激钳制电压下，其内向电流均较对照组减小。图2-5d显示，与对照组相比，siRNA组细胞的电流密度明显减小；对照组和siRNA组在+10 mV时记录到的平均峰值电流密度分别是 -2.76 ± 0.34 pA/pF和 -1.58 ± 0.26 pA/pF ($P < 0.05$ ，图2-5d)。应用

10 μM Bay K8644后, 在+10 mV时记录到的最大内向电流密度增大1.5倍左右; 对照组和siRNA组在的平均峰值电流密度分别是 -4.75 ± 0.44 pA/pF和 -2.72 ± 0.34 pA/pF ($P < 0.05$, 图2-5e)。膜片钳结果证明, Cav1.2的表达下调能够抑制成骨细胞LTCCs的电活动。

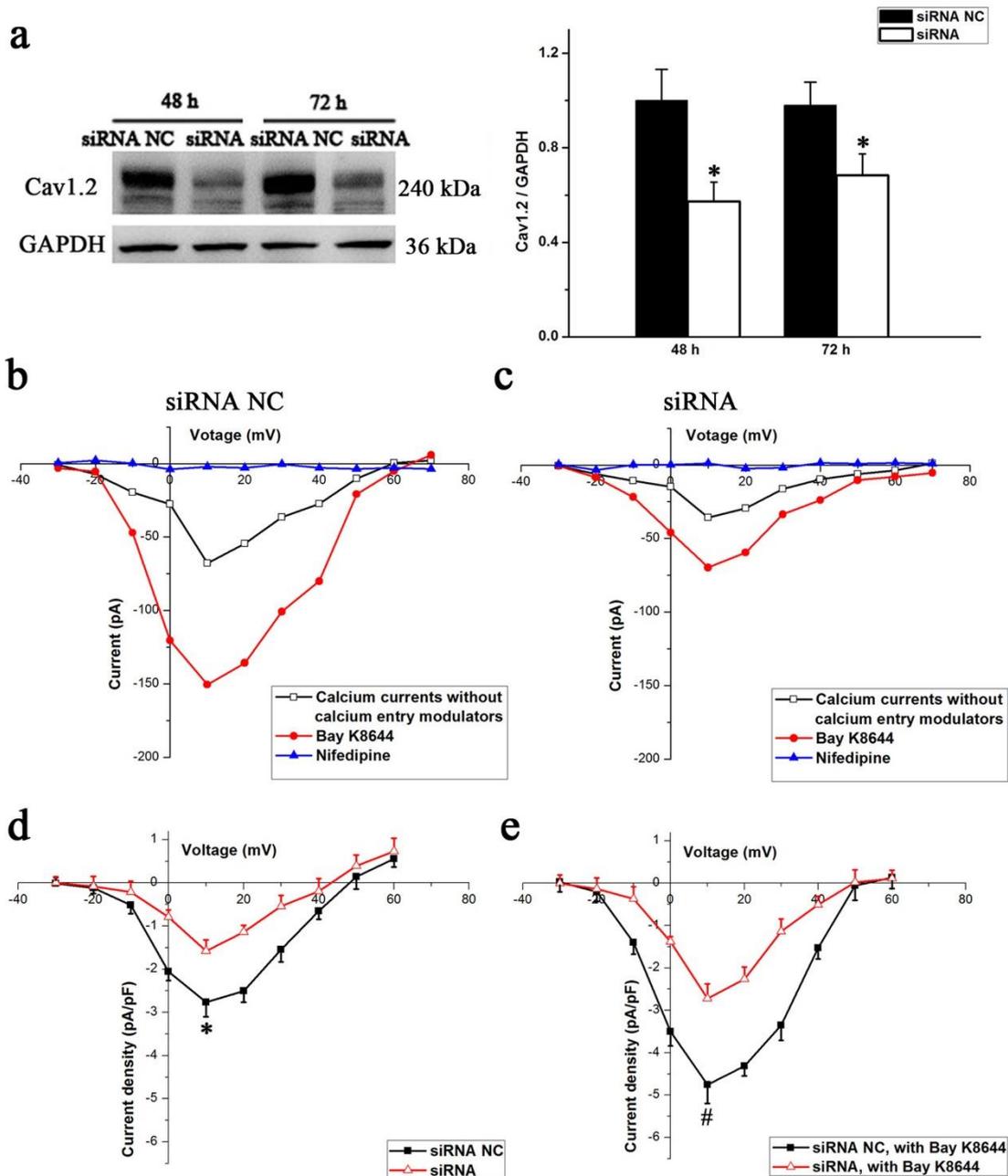


图 2-5 Cav1.2 蛋白水平的变化对成骨细胞 LTCCs 电活动的影响

Figure 2-5 Effects of changes in the Cav1.2 subunit protein on LTCC currents. (a)

MC3T3-E1 cells were transfected with Cav1.2 siRNA and negative control (NC) siRNA (70 nM) for 12 h, followed by postincubation for 48 and 72 h additional hours. Western blot analysis indicates the magnitude and duration of Cav1.2 subunit suppression ($n = 4$, $\alpha = 0.05$, $^*P = 0.016$). Bars represent the mean \pm s.d. with two-tailed Student's *t*-test against control samples. (b) I-V curves for the siRNA NC group. (c) I-V curves for the siRNA group. (d) and (e) Comparison of changes in the LTCC current densities in MC3T3-E1 cells of the siRNA NC group ($n = 12$ cells) and the siRNA group ($n = 13$ cells), regardless of whether the LTCCs were activated by Bay K8644 ($\alpha = 0.05$, $^*P = 0.036$, $^{\#}P = 0.013$). The values are the mean \pm s.d., and statistically significant differences were determined using a one-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test.

3.5 阻断 LTCCs 或下调 Cav1.2 表达加剧模拟失重对成骨细胞增殖的抑制作用

第一部分的实验表明模拟失重抑制成骨细胞的增殖，本部分的实验证明模拟失重抑制LTCCs功能和Cav1.2的蛋白表达。为进一步验证模拟失重对成骨细胞增殖的负性调控是否通过抑制LTCCs功能来实现，为了解决这个问题，我们设计实验如下。

首先在回转处理细胞时，在培养基中加入10 μ M的nifedipine，回转结束后应用CCK-8法检测MC3T3-E1的增殖能力。图2-6a表明nifedipine组的细胞增殖能力与单纯回转组相比显著减弱，且在96 h内两组细胞间的活性差异仍具有显著意义（ $^*P < 0.05$ ， $^{**}P < 0.01$ ）。接下来在转染Cav1.2 siRNA的6 h后进回转操作，结果发现siRNA组的细胞增殖能力较siRNA NC组显著减弱，且在96 h内两组细胞间的活性差异仍具有显著意义（ $^*P < 0.05$ ， $^{**}P < 0.01$ ）。

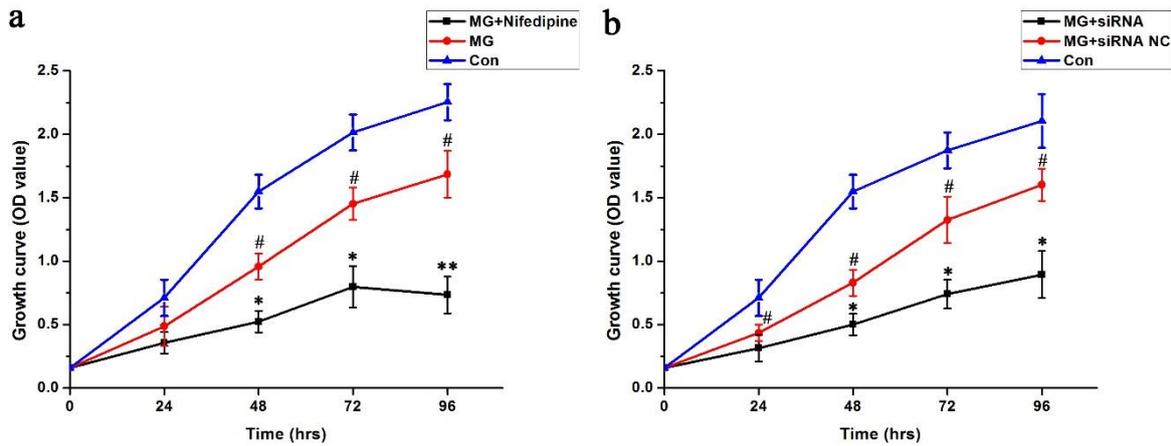


图 2-6 模拟失重环境下阻断 LTCCs 或下调 Cav1.2 的表达对成骨细胞增殖的影响

Figure 2-6 Effects of Cav1.2 knockdown or LTCCs blocking on the proliferation of osteoblast in the simulated microgravity.

(a) Comparison of changes of cell growth between MG and MG+nifedipine groups. (b) Comparison of changes of cell growth between MG and MG+siRNA groups. The cells were seeded on 96-well plates at a density of 2,000 cells/well. Cell proliferation was evaluated by a WST-8 assay at 24-96 h ($n = 3$). The results were expressed as the mean \pm s.d. with two-tailed Student's t test against control samples. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, compared with MG group and # $P < 0.05$ compared with stationary control.

4 讨论

航天飞行下的失重环境对航天员的身心健康产生诸多不利影响，这些不利影响主要集中在心血管系统功能失代偿和持续性骨质丢失上。失重环境对骨骼系统的影响主要是导致骨量减低，骨质矿化形式的改变和细胞外基质分泌减少，这些都已经是在航天员和模拟失重大鼠模型上得到了验证^[143, 144]。虽然失重环境对骨骼的负性影响已经有明确结论，但是这种无负荷状态抑制成骨细胞功能的机制还尚未阐述。本部分实验证明了模拟失重通过下调成骨细胞 Cav1.2 蛋白的表达抑制 LTCCs 的功能，从而负性调控成骨细胞的增殖。

现有研究表明，LTCCs 参与到机械力刺激引起的自分泌或旁分泌因子的生成释放^[146, 147]和某些基因表达的改变^[148]。有学者在大鼠和小鼠模型上研究发现，阻断 LTCCs 能够大幅减弱机械刺激引起的骨生成增加^[15]。这些研究均证实了 LTCCs 可影

响成骨细胞的功能和骨代谢。本部分实验中主要采用膜片钳技术检测了模拟失重环境对小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 上 LTCCs 电活动的影响。通过检测内向电流的变化,发现模拟失重环境显著抑制成骨细胞 LTCCs 电流密度;同时应用 Calcium imaging 技术再次验证了这个结论,模拟失重能够降低 Bay K8644 诱导的成骨细胞内钙离子浓度的增高。大量研究证实,众多的骨代谢调节因子,包括甲状旁腺激素^[149, 150],维生素 D^[149]和机械刺激^[151, 152]都能够激活和增强成骨细胞 LTCCs 的功能。上述研究结果提示,失重环境作为无机械负荷状态的一种,能够抑制成骨细胞上 LTCCs 的功能。

一些证据表明,当成骨细胞上 LTCCs 激活时,骨形成增加而骨吸收减少^[13, 14]。有学者研究表明,表皮生长因子(EGF)可以促进成骨细胞的增殖,但是在应用 LTCCs 的特异性阻断剂——维拉帕米后,EGF 的促增殖作用完全消失^[153]。不仅如此,在大鼠与人原代细胞或细胞系的实验中均证实了 LTCCs 的另一种特异性阻断剂——nifedipine 能够在很大程度上抑制鞘磷脂诱导的成骨细胞的增殖^[154]。在本实验中,我们应用 LTCCs 的特异性阻断剂 nifedipine 和 LTCCs 核心亚基 Cav1.2 的特异性 siRNA 来完成对 LTCCs 功能的抑制,之后我们检测了 LTCCs 功能抑制后成骨细胞在模拟失重环境下增殖能力的变化。结果表明,阻断 LTCCs 或下调 Cav1.2 的表达加剧了模拟失重对成骨细胞增殖的抑制作用。多数研究表明钙离子通道特别是 LTCCs 在调控成骨细胞增殖方面较调控细胞分化发挥更大的作用^[155]。通过 LTCCs 进入细胞内的 Ca^{2+} 能够激活 $Ca^{2+}/CaM/CaMK$ 信号通路,从而促进成骨细胞的增殖。还有研究报道, $Ca^{2+}/CaM/CaMK$ 信号通路是 CaMK 依赖的,并且最终可以激活细胞周期蛋白的表达,同时加快成骨细胞进入细胞周期的速率^[156, 157]。

本部分实验也存在一些不足。首先,考虑到膜片钳技术操作的难度较大,我们只是在小鼠前成骨细胞系 MC3T3-E1 上验证了模拟失重对成骨细胞上 L 型钙离子通道功能的抑制作用,虽然 MC3T3-E1 是研究成骨细胞公认的细胞模型,但是我们还需要在其他种属的细胞系或者原代细胞上进一步验证本部分实验的结论。其次,LTCCs 由孔道形成亚基 α_1 和辅助亚基 $\alpha_2\delta$ 和 β 组成,而这些亚基作为组成离子通道的一个整体,分别对通道的功能有着不同的影响;本实验只是对 LTCCs 中最重要的 Cav1.2 这个功能亚基进行观测,并没有涉及到其他的辅助亚基,下一步我们要对组成 LTCCs 的其他亚基进行研究。最后,在验证模拟失重对成骨细胞增殖的抑制作用是通过 LTCCs 实现的实验中,我们只是在模拟失重环境下抑制 LTCCs 的功能后进一步

步检测成骨细胞的增殖能力，并没有在 LTCCs 激活状态下检测成骨细胞增殖能力的变化，原因在于 LTCCs 的特异性激动剂 Bay K8644 只有在细胞膜除极化的状态下才能对 LTCCs 发挥激活作用，而在本实验的条件下 Bay K8644 并不能激动 LTCCs；另外，由于 LTCCs 的核心亚基 Cav1.2 的基因全长在 8,000 bp 以上，很难通过构建合适的质粒将这个功能片段过表达后开展研究。

综上所述，本部分实验证明，模拟失重通过下调 MC3T3-E1 上 Cav1.2 的表达降低 LTCCs 的功能，从而抑制成骨细胞的增殖。本部分实验为阐明失重对成骨细胞增殖的负性调控提供了一个新机制。

第三部分 模拟失重通过 miR-103/Cav1.2 信号通路抑制 MC3T3-E1 前成骨细胞的增殖

第二部分的实验发现，模拟失重抑制成骨细胞上 LTCCs 的功能，且阻断 LTCCs 或下调 Cav1.2 的表达加剧模拟失重对成骨细胞增殖的抑制作用。但是模拟失重是如何下调 Cav1.2 的表达从而降低 LTCCs 的功能进而抑制成骨细胞增殖的具体机制尚不清楚。

成骨细胞 Cav1.2 在转录翻译过程中受到多种因子的调控，其中 miRNA 成为近年来的研究热点。miRNA 是一种由约 22 个核苷酸构成的单链非编码小 RNA，广泛分布于真核生物细胞中，表达具有时序性、高度的进化保守性和组织特异性等生物学特点^[21, 22]。miRNA 通过精细调控多种基因的表达而参与到真核细胞的多种生物学过程中。miRNA 通过与其靶 mRNA 的互补配对在转录后水平对基因表达量进行精细调控，miRNA 主要通过以下三种方式沉默靶 mRNA：将靶 mRNA 片段切断；通过减少 mRNA 多聚 A 尾的长度影响 mRNA 的稳定性和通过和 mRNA 结合从而干扰 mRNA 的翻译效率^[23, 24]。目前研究表明，在不同组织来源的细胞中多种 miRNA 参与到 Cav1.2 的表达调控，分别是 miR-1^[25, 26]，miR-137^[27]，miR-328^[28]，miR-145^[29]，miR-155^[30]和 miR-103^[31]。但是，在成骨细胞中 miRNA 参与调控 Cav1.2 的表达鲜有报道。

本部分实验通过分析模拟失重条件下 Cav1.2 mRNA 的变化，发现 Cav1.2 基因蛋白差异表达，所以将模拟失重条件下成骨细胞 Cav1.2 的调控研究集中在转录后水平调节因子 miRNA 上。首先，我们在能够调节 Cav1.2 的 miRNA 中筛选出在模拟失重条件下发生变化的 miRNA；其次，在模拟失重环境下成骨细胞中验证这个 miRNA 对 Cav1.2 的靶向调节作用；最后，我们验证筛选出来的 miRNA 是不是能够通过 Cav1.2 对成骨细胞的增殖起到调控作用。

1 材料

1.1 实验细胞（同第一部分）

1.2 主要器材（其余同前）

PCR 仪	Applied Biosystems 公司
小型高速离心机	美国 SBP 公司
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Thermos公司
梯度PCR仪TP600型	TaKaRa公司
电泳仪TY2795型	BIO-RAD公司
电泳槽491型	BIO-RAD公司
凝胶成像分析系统GelDocXR型	BIO-RAD公司

1.3 主要试剂（其余同前）

异丙醇	上海国药集团化学试剂有限公司
丙三醇	上海国药集团化学试剂有限公司
氢氧化钠	上海国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇	上海国药集团化学试剂有限公司
RNAiso	TaKaRa公司
SYBR [®] Premix Ex Taq [™] II	TaKaRa公司（DRR 820A）
Nde I	TaKaRa 公司（货号 1161A）
0.1% DEPC水	西安科昊生物公司
琼脂糖	上海生工生物工程股份有限公司
Cav1.2和GAPDH引物	上海生工生物工程股份有限公司
miRNAs引物	上海生工生物工程股份有限公司
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche 公司（货号 1636090910）
地高辛杂交检测试剂盒（化学发光法）	Roche 公司（货号 11585614910）
DNA Molecular-Weight Marker	Roche 公司（货号 11218590910）

HyBond N+正电荷尼龙膜

Amersham 公司（货号 RPN303B）

2 方法

2.1 细胞培养（同第一部分实验）

2.2 2 D 回转器模拟细胞失重效应（同第一部分实验）

2.3 总 RNA 提取及鉴定

2.3.1 细胞总 RNA 提取

- 1) 处理后的细胞弃去培养基，用预冷的 PBS 洗涤 3 遍，倾倒多余的 PBS，后加入 RNAiso 进行细胞裂解，小心吹打细胞，室温裂解 2 min 后移入 1.5 ml 无菌无酶的 EP 管中，室温静置 5 min；按照 1 个 6 孔板加入 1 ml RNAiso 计算用量；
- 2) 在 1.5 ml 的 EP 管中加入 1/5 RNAiso 量（200 μ l）的三氯甲烷，充分震荡 30 s，待溶液充分乳化后室温静置 10 min，待溶液完成萃取分层；
- 3) 4 $^{\circ}$ C、12,000 rpm 离心 15 min，溶液离心后分为 3 层：含有总 RNA 的无色上清层，中间层含有 DNA 和蛋白层及粉红色有机层，小心的用移液器吸取上清液 200 μ l，移至新的 1.5 ml 无酶 EP 管中；
- 4) 在 EP 管加入与上清液等体积 200 μ l 的异丙醇，上下颠倒混匀 20 次后室温静置 10 min，之后将 EP 管置于 -20 $^{\circ}$ C 内过夜，次日 4 $^{\circ}$ C、12,000 rpm 离心 10 min；
- 5) 离心后小心弃去上清液体，加入 4 $^{\circ}$ C 预冷的 100%乙醇，上下颠倒混匀，充分洗涤沉淀，7500 rpm、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min；
- 6) 离心后小心弃去上清，管底部可见总白色或半透明的 RNA 沉淀，倒扣 EP 管，室温干燥 30 min，待有机溶剂完全挥发；
- 7) 在 EP 管内加入 20 μ l DEPC 水溶解沉淀，用移液器充分吹匀使得沉淀充分溶解，置于冰上，待下一步进行 RNA 浓度检测。

2.3.2 细胞总 RNA 浓度和纯度检测

RNA 的最大吸收波长为 260 nm，而蛋白质的吸收波长为 280 nm，因此用 260 nm 波长测定 RNA 浓度，用 280 nm 波长判断样品的提取质量。吸 2 μ l 总 RNA 溶液，置

于 Nanodrop 中检测各项指标，以 DEPC 水作为空白对照校零，读取总 RNA 浓度、OD₂₆₀、OD₂₈₀ 及 OD₂₆₀/OD₂₈₀。RNA 的纯度用 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 表示，选取 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.9-2.0 之间的样品用于后续实验。若 OD₂₆₀/OD₂₈₀>2.0 表明 RNA 可能存在降解，这与标本保存时间过久或者在提取步骤中存在操作不当等因素有关；若 OD₂₆₀/OD₂₈₀<1.8 提示样品可能存在蛋白质污染。每个样品重复 3 次测量。

2.3.3 非变性琼脂糖凝胶电泳

- 1) 琼脂糖凝胶的配制：取 1.2 g 琼脂糖于烧瓶中，加入 100 ml TAE 溶液，充分摇晃后，放入微波炉加热至沸腾 2 次；室温下冷却溶液至 50℃ 左右时，小心加入 5 μl EB，轻轻摇晃烧瓶（避免出现气泡），使 EB 充分溶解；然后将溶液倒入凝胶槽中制胶，待溶液凝固变硬后，垂直拔出梳子，将凝胶板放入加有 TAE 溶液的电泳槽中（加样孔一端置于负极位置），加足量 TAE 电泳液至覆盖胶面；
- 2) RNA 样品的准备：取 10 μl 上述 RNA 样品于无酶 PCR 管中，加入 12 μl loading buffer，以此比例配制适量的上样溶液；
- 3) 电泳：在每个胶孔中加入上述配置好的液体 20 μl，90 V 电压恒定压力电泳，维持 25 min；
- 4) RNA 完整性和纯度判定：紫外光照射下，我们可以观察到在不同位置存在清晰的条带，这些位置分别是 28 S、18 S、5.8 S（5 S），并且第二条带的亮度应近似为第一条带亮度的一半，这说明样品 RNA 纯度和完整性较好。

2.4 Northern blotting

2.4.1 引物设计

SNB036-Cacna1c: F-5' -CGACTCCAACGCCACCA-3'

SNB036-Cacna1c: R-5'-TCCCATCATACATCACCGAAT-3'

SNB036-GAPDH: F-5'-GAGTGTTTCCTCGTCCCGTAG-3'

SNB036-GAPDH: R-5'-GGTCCTCAGTGTAGCCCAAG-3'

2.4.2 探针制备

- 1) PCR 反应体系的建立

表 3-1 PCR 反应体系液配置表

成分	体积
H ₂ O	Up to 50 μ l
PCR buffer with MgCl ₂	5 μ l
PCR DIG Probe Synthesis Mix	5 μ l
正向引物	0.5 μ l
反向引物	0.5 μ l
Enzyme mix	0.75 μ l
cDNA	1 μ l

表 3-2 PCR 反应程序

反应温度	作用	反应时间
95°C	预变性	2 min
95°C	变性	30 s
56°C	退火	30 s
72°C	延伸	2 min
72°C	复性	10 min

2) 琼脂糖凝胶电泳

PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳对照 DNA 片段 (1697 bp) 进行切胶回收, 待用。

2.4.3 电泳、转膜、杂交、洗膜和信号检测

严格按照 Northern blotting 操作流程完成后续步骤。

2.5 Quantitative RT-PCR

2.5.1 反转录 PCR

按照 Takara 公司 PrimeScript[®] RT 反转录试剂说明书, 加入以下试剂 (此步实验应在冰上完成且尽量缩短操作时间, 以避免 RNA 的降解):

表 3-3 反转录 PCR 混合反应液配置表

试剂	使用量	终浓度
PrimeScript [®] RT Enzyme Mix I	1.0 μ l	
Bulge-loop RT Primer	1.0 μ l	100 nM
PrimeScript [®] Buffer	4.0 μ l	1 \times
Total RNA	X	40 ng/ μ l
RNase Free ddH ₂ O	up to 20 μ l	

2.5.2 上机检测

1) PCR 引物设计（上海生工生物工程有限公司合成）

表 3-4 合成引物序列

基因名称	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
Cav1.2 (1)	TTGCCCTTCTTGCTCTTC	TATGCCCTCCTGGTTGTAGC
Cav1.2 (2)	TGCTGTGCTGACCCTGAAG	CGTCTCCGGAAAGGAATA
GAPDH	CATGTTCCAGTATGACTCCACTC	GGCCTCACCCATTGATGT
miR-155	ACACTCCAGCTGGGTTAATGCTAATTGTG	TGGTGTCGTGGAGTCG
miR-137	ACACTCCAGCTGGGTTATTGCTTAAG	TGGTGTCGTGGAGTCG
miR-1	ACACTCCAGCTGGGTGGAATGTAAAGA	TGGTGTCGTGGAGTCG
miR-328	ACACTCCAGCTGGGCTGGCCCTCTCTG	TGGTGTCGTGGAGTCG
miR-145	ACACTCCAGCTGGGTCCAGTTTTCCC	TGGTGTCGTGGAGTCG
miR-103	ACACTCCAGCTGGGAGCAGCATTGTAC	TGGTGTCGTGGAGTCG
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTGCGT

2) 根据 Takara 公司 SYBR Premix Ex Taq II[®]试剂说明书要求，在冰上配制 10 μ l quantitativeRT-PCR 反应体系（液体配制在冰上进行）

表 3-5 qRT-PCR 反应液配置表

试剂	使用量	终浓度
ROX Reference Dye II	0.2 μl	1 \times
PCR Forward Primer	0.8 μl	0.4 μM
PCR Reverse Primer	0.8 μl	0.4 μM
SYBR Premix Ex Taq TM II [®]	5.0 μl	1 \times
ddH ₂ O (灭菌蒸馏水)	2.2 μl	8.0 μl
cDNA模板	1.0 μl	
Total	10.0 μl	

- (3) 取 10 μl 混合好的 PCR 反应液加到八联管的孔中, 设置 4 个复孔, 5,000 rpm 离心 30 s, 然后上机进行 PCR 反应;
- (4) 使用 ABI 公司荧光定量 PCR 仪自带的软件分析系统, 对目的基因表达水平进行分析, 且采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行分析数据。

2.6 siRNA、miRNAs mimic 和 inhibitor 转染

- 1) 根据数据库中小鼠 miR-103 的基因编号, 委托广东锐博生物工程有限公司设计合成出 miR-103 的 mimic 和 inhibitor 及其对应阴性对照;
- 2) 将常规培养 MC3T3-E1 细胞接种于 6 孔板内, 待细胞汇合度在达到 70%-80%后, 换用 Opti-MEM 培养液预先培养细胞 2 h;
- 3) 吸 250 μl Opti-MEM 培养液于 EP 管中, 加入 5 μl Lipofectamine 2000 充分混匀, 常温静置 5 min;
- 4) 吸取 5 μl miRNA 溶液及阴性对照无序的 RNA 溶液, 分别再加入 250 μl Opti-MEM 培养液充分稀释, 轻柔吹打, 使其混匀;
- 5) 将 3) 和 4) 中所配置的溶液混合, 轻柔吹打, 室温静置 20 min, 使 Lipofectamine 2000 能够充分包裹 miRNA, 形成稳定的复合物;
- 6) 弃去培养皿内待转染孔中的培养液, 加入 5) 中配置的溶液 1 ml 常规培养, 轻轻摇动细胞培养皿使其充分混匀, 置入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 的培养箱重培养;
- 7) 转染 6 h 后将吸取培养液, 换为无双抗 10% 血清的常规培养液, 待 12 h 后行 qPCR

检测 miR-103 表达量;

8) 同 siRNA 转染步骤第一部分实验;

9) miRNAs 序列分别为:

表 3-6 设计合成 miRNAs 序列

Oligonucleotide	sense sequences	antisense sequences
miR-103 mimic	5'- AGUAUCGGGACAUGUUACGACGA -3'	5'- UCGUCGUAACAUGUCCCGAUACU -3'
miR-103 mimic NC	5'- GUCAUGAAAACACAUCAUGUUU -3'	5'- AAACAUGAUGUGUUUCAUGAC -3'
miR-103 inhibitor	5'- UCGUCGUAACAUGUCCCGAUACU -3'	
miR-103 inhibitor NC	5'- GUCAUGAAAACACAUCAUGUUU -3'	

2.7 EdU 检测细胞增殖（同第一部分）

2.8 CCK-8 法检测细胞增殖（同第一部分）

2.9 统计分析

所有数据以均数±标准差表示，采用 SPSS 19.0 软件先对数据进行正态性分析和方差齐性检验，当进行两样本间比较时采用独立 *t* 检验；当进行同一样本多次测量的多样本分析时采用重复测量方差分析（Repeated-Measures ANOVA），组间比较采用 Bonferroni post hoc 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 模拟失重上调成骨细胞 Cav1.2 mRNA 的表达

第二部分实验已经验证了模拟失重抑制 Cav1.2 蛋白的表达，为了探究模拟失重调控 Cav1.2 蛋白表达的机制，我们采用多种手段对模拟失重环境下 Cav1.2 mRNA 进行检测。首先，我们采用 Northern blotting 技术检测模拟失重环境下 Cav1.2 mRNA 表达水平的变化。如图 3-1 所示，在模拟失重条件下，与对照组相比 Cav1.2 mRNA 的表达水平增高约为 1.6 倍（ $P < 0.05$ ）。

与 Northern blotting 技术方法相比，实时定量荧光 PCR（qPCR）是较为敏感有

效的检测样品 mRNA 含量的方法, 目前, qPCR 已经广泛使用并成为定量检测 mRNA 水平的金标准。为了进一步明确模拟失重对成骨细胞 Cav1.2 mRNA 表达的影响, 我们同样使用 2 种不同引物进行定量检测。在模拟失重条件下, 与对照组相比, Cav1.2 mRNA 的表达水平分别增高 1.5 倍 ($P < 0.05$, 图 3-2a) 和 1.6 倍 ($P < 0.05$, 图 3-2b)。

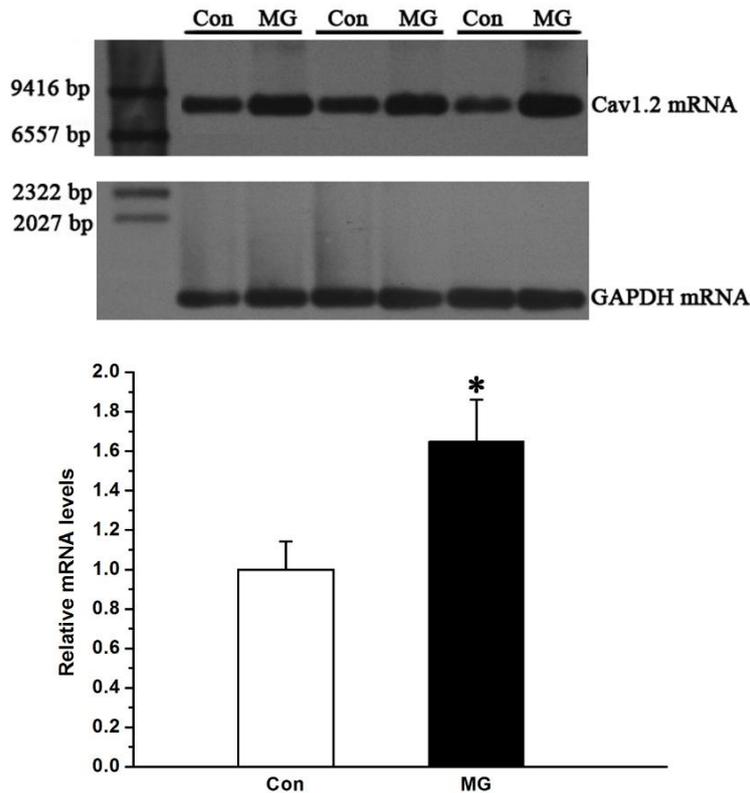


图 3-1 Northern blotting 检测模拟失重环境下成骨细胞 Cav1.2 mRNA 的表达

Figure 3-1 Detecting changes in Cav1.2 mRNA level in MC3T3-E1 cells under simulated microgravity conditions by northern blotting. Northern blot analysis of Cav1.2 mRNA expression from cell lysates from MC3T3-E1 under normal gravity and simulated microgravity conditions. GAPDH detection on the same blots was used to verify equal loading among the various lanes (*upper*). Histogram showing the average data for the relative expression of Cav1.2 mRNA present in the cells from the Con and MG groups, which was quantified by the camera-based detection of emitted chemiluminescence (*lower*) ($n = 3$, $*P < 0.05$). Bars represent the mean \pm s.d. with two-tailed Student's *t*-test against control samples.

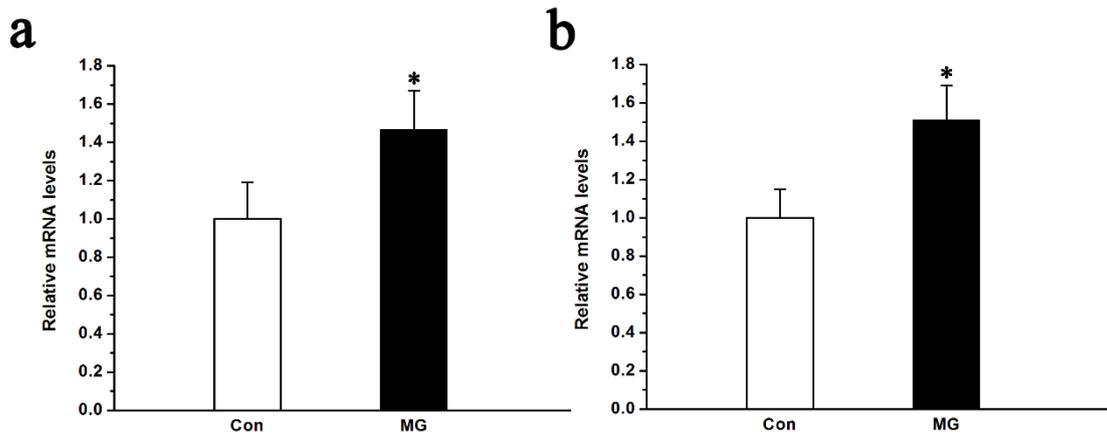


图 3-2 qPCR 检测模拟失重环境下成骨细胞 Cav1.2 mRNA 的表达变化

Figure 3-2 Detecting changes in Cav1.2 mRNA level in MC3T3-E1 cells under simulated microgravity conditions by QPCR. (a) QPCR analysis of changes in Cav1.2 mRNA level by using the original Cav1.2 primer pair in MC3T3-E1 cells under simulated microgravity conditions ($n = 4$, $\alpha = 0.05$, $*P = 0.035$). (b) QPCR analysis of changes in Cav1.2 mRNA level by using the new selected Cav1.2 primer pair in MC3T3-E1 cells under simulated microgravity conditions ($n = 4$, $\alpha = 0.05$, $*P = 0.029$). Bars represent mean \pm s.d. with two-tailed Student's t -test against control samples.

3.2 模拟失重上调成骨细胞 miR-103 的表达

成骨细胞 Cav1.2 在转录翻译过程中受到多种因子的调控，且模拟失重条件下 Cav1.2 基因蛋白差异表达，这提示模拟失重环境下 Cav1.2 调控可能存在转录后水平调节。miRNA 是近年来基因转录后水平调节机制的研究热点，因此，通过文献检索，我们对已报道的可以调控 Cav1.2 的 6 条 miRNA 进行了研究。

首先，我们检测了模拟失重环境下 miR-1, miR-137, miR-328, miR-145, miR-155 和 miR-103 的表达变化。图 3-3a 表明，回转 48 h 后只有 miR-103 表达上调，约为对照组的 1.5 倍 ($P < 0.05$)。之后我们又观察了 miR-103 随回转时间变化的情况，图 3-3b 表明，在 96 h 的观察时间内，miR-103 表达逐渐增高，且与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

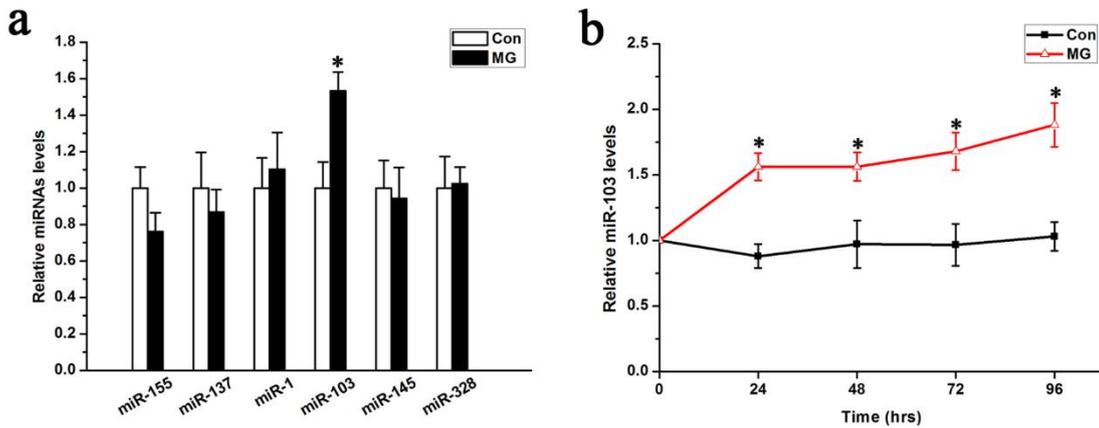


图 3-3 qPCR 检测模拟失重环境下成骨细胞 miR-103 的表达变化

Figure 3-3 Alteration of miRNAs in osteoblasts under simulated microgravity conditions. (a) QPCR analysis of changes in the expression of miR-155, miR-137, miR-1, miR-103, miR-145 and miR-328 in MC3T3-E1 cells under simulated microgravity conditions ($n = 6$, $\alpha = 0.05$, $*P = 0.021$). (b) QPCR analysis of change of expression of miR-103 at sequential time points (from 24 h to 96 h) under the condition of simulated microgravity ($n = 5$). The results were expressed as the mean \pm s.d. with two-tailed Student's t test against control samples. $*P < 0.05$ compared with stationary control.

3.3 降低 miR-103 的表达能够部分恢复模拟失重诱导的 Cav1.2 表达下调

为了验证模拟失重环境下 miR-103 对 Cav1.2 的靶向调控作用,我们采用 Western blotting 技术在转染 miR-103 inhibitor 后检测 Cav1.2 蛋白表达水平。首先验证由锐博公司合成的 inhibitor 对 miR-103 的沉默效率,图 3-4a 表明,与对照组相比,转染 inhibitor 的细胞 miR-103 表达明显降低 ($P < 0.05$)。如图 3-4b 所示,模拟失重环境下,与 inhibitor 阴性对照相比,转染 inhibitor 的细胞 Cav1.2 蛋白水平显著增加 ($P < 0.05$),但是没有恢复到原有空白对照水平 ($P < 0.05$)。以上数据表明抑制 miR-103 的表达能够部分恢复模拟失重诱导的 Cav1.2 表达下调。

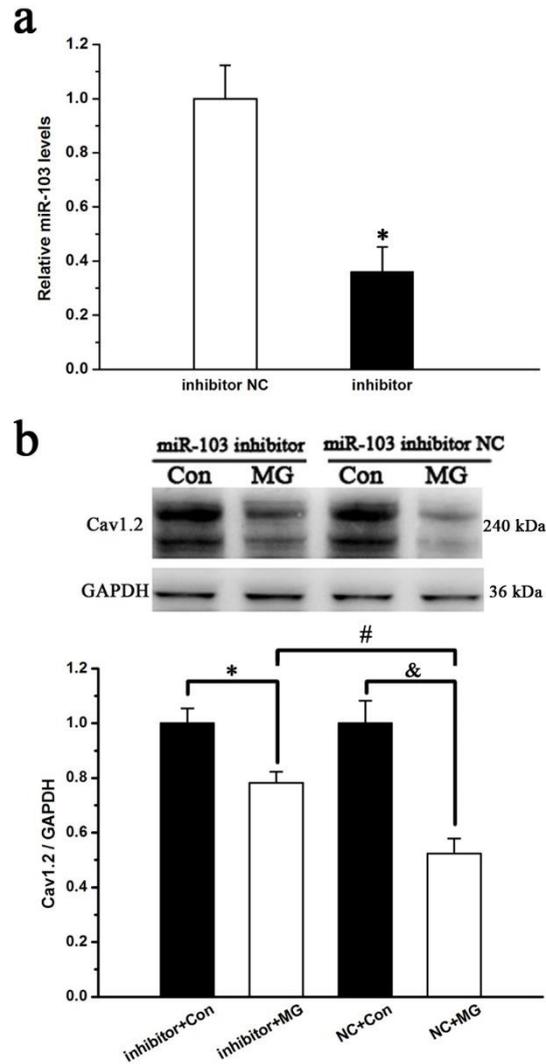


图 3-4 模拟失重环境下降低 miR-103 的表达对成骨细胞 Cav1.2 蛋白表达的影响
Figure 3-4 Effects of miR-103 knockdown on Cav1.2 subunit expression under simulated microgravity conditions. (a) Knockdown of endogenous miR-103 by a miR-103 inhibitor in MC3T3-E1 cells ($n = 4$, $\alpha = 0.05$, $*P = 0.016$). (b) Western blot analysis of the role of miR-103 in regulating the expression of the Cav1.2 subunit under simulated microgravity conditions ($n = 4$, $\alpha = 0.05$, $*P = 0.022$, $\#P = 0.017$, $\&P = 0.016$). Bars represent the mean \pm s.d. with two-tailed Student's t -test against control samples.

3.4 降低 miR-103 的表达能够部分对抗模拟失重对 LTCCs 电活动的抑制作用

为了进一步验证 miR-103 对 Cav1.2 蛋白水平的影响，我们又观察了 miR-103 对成骨细胞 LTCCs 电活动的影响。如图 3-5a 和 b 所示，在正常重力环境下，inhibitor

组和 inhibitor 阴性对照组细胞的内向电流没有改变;然而在模拟失重环境下, inhibitor 组(图 3-5d)细胞的内向电流大小与阴性对照(图 3-5c)相比增大。图 3-5e 和 f 显示,在模拟失重环境下,与阴性对照组相比, inhibitor 组细胞的电流密度明显减小($P < 0.05$);阴性对照组和 inhibitor 组在+10 mV 时记录到的平均峰值电流密度分别是一 2.02 ± 0.38 pA/pF 和 -2.86 ± 0.33 pA/pF ($P < 0.05$, 图 3-5e)。应用 10 μ M Bay K8644 后,在+10 mV 时记录到的最大内向电流密度增大 1.6 倍左右;阴性对照组和 inhibitor 组在+10 mV 时记录到的平均峰值电流密度分别是一 2.93 ± 0.32 pA/pF 和 -4.34 ± 0.43 pA/pF ($P < 0.05$, 图 3-5f)。在正常重力环境下, miR-103 inhibitor 对成骨细胞 LTCCs 的电活动没有影响(图 3-5e 和 f)。膜片钳结果证明,降低 miR-103 的表达能够部分对抗模拟失重对 LTCCs 电活动的抑制作用。

3.5 在模拟失重环境下 miR-103 抑制成骨细胞的增殖

在第一和第二部分实验我们已经证明,模拟失重通过降低 LTCCs 的功能抑制成骨细胞的增殖。在本部分实验中,我们发现 miR-103 在模拟失重环境下上调,且能够靶向调节 Cav1.2。为了验证 miR-103 是否参与成骨细胞增殖的调节。

我们设计了如下实验。首先,检测 miR-103 mimic 和 miR-103 inhibitor 的应用效率。如图 3-6 所示, miR-103 mimic 组细胞内 miR-103 的含量较 mimic NC 组显著提高($P < 0.01$); miR-103 inhibitor 组细胞内 miR-103 的含量较 inhibitor NC 组明显降低($P < 0.01$)。其次,在模拟失重环境下上调或下调 miR-103 的表达,然后用不同手段检测成骨细胞增殖能力的变化。EdU 染色分析结果显示,在模拟失重环境下, miR-103 的上调抑制成骨细胞的增殖($P < 0.05$, 图 3-7a 和 b);而 miR-103 的下调促进成骨细胞的增殖($P < 0.05$, 图 3-7a 和 b)。如图 3-7c 所示,在模拟失重环境下,过表达 miR-103 降低成骨细胞 PCNA 的表达;沉默 miR-103 促进成骨细胞 PCNA 的表达($P < 0.05$)。另外,采用 CCK-8 法进一步验证,在模拟失重环境下, mimic 组成骨细胞增殖能力减弱($P < 0.05$, 图 3-7d);而 inhibitor 组成骨细胞增殖能力增强($P < 0.05$, 图 3-7e)。

CCK-8 法和 PCNA 蛋白含量检测方法得到的结论和 EdU 染色结果一致,均证明在模拟失重环境下 miR-103 抑制成骨细胞的增殖。

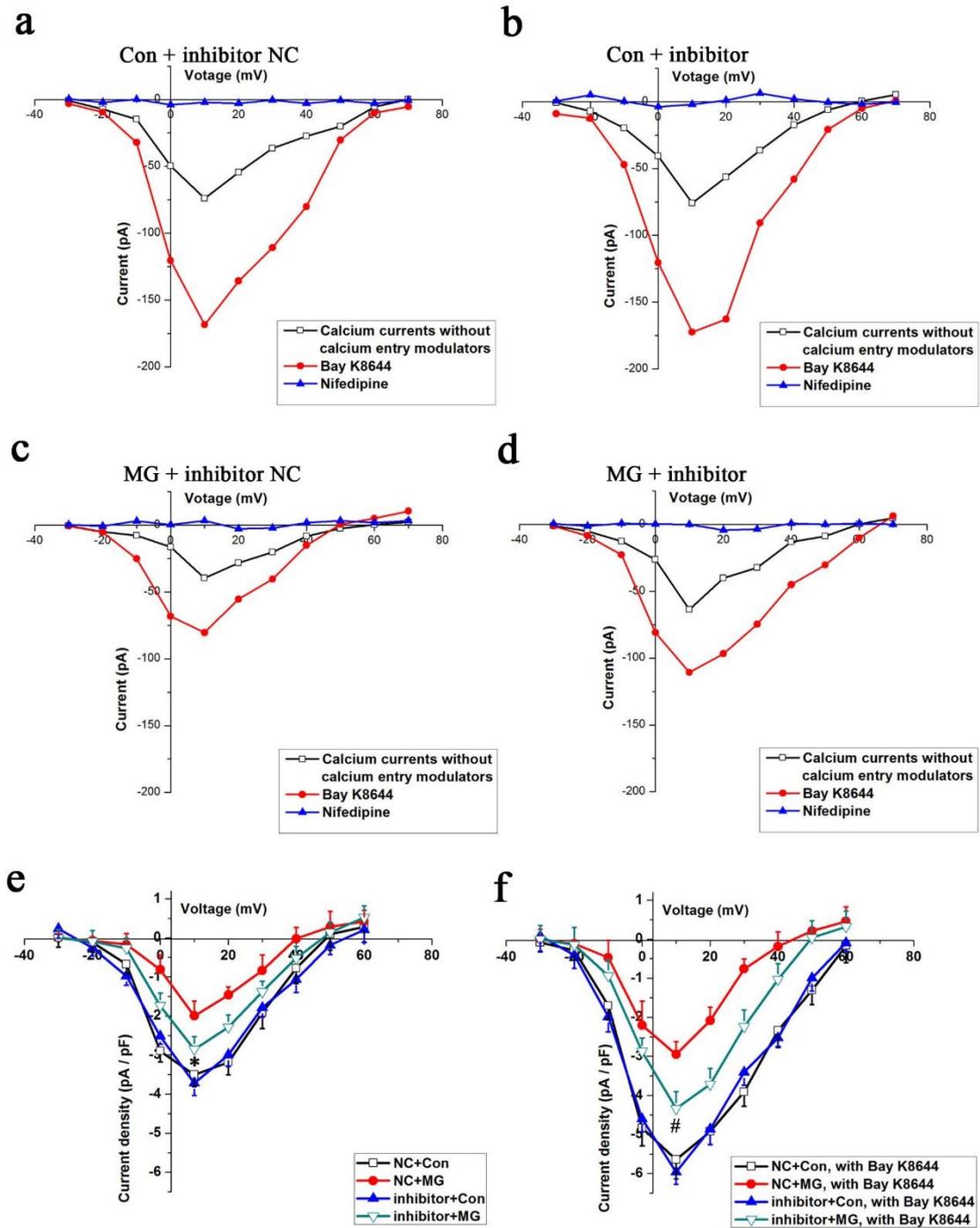


图 3-5 模拟失重环境下降低 miR-103 的表达对成骨细胞 LTCCs 电活动的影响

Figure 3-5 Effects of miR-103 knockdown on LTCC currents in MC3T3-E1 cells under simulated microgravity conditions. (a) I-V curves for the Con + miR-103 inhibitor NC group. (b) I-V curves for the Con + miR-103 inhibitor group. (c) I-V curves for the MG + miR-103 inhibitor NC group. (d) I-V curves for the MG + miR-103 inhibitor group. (e) and (f) Comparison of changes in the LTCC current densities in cells of the

miR-103 inhibitor NC + MG group (red, n = 12 cells) and the miR-103 inhibitor + MG group (green, n = 14 cells), regardless of whether the LTCCs were activated by Bay K8644 ($\alpha = 0.05$, $^*P = 0.032$, $^{\#}P = 0.006$). The values are the mean \pm s.d., and statistically significant differences were determined using a one-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test.

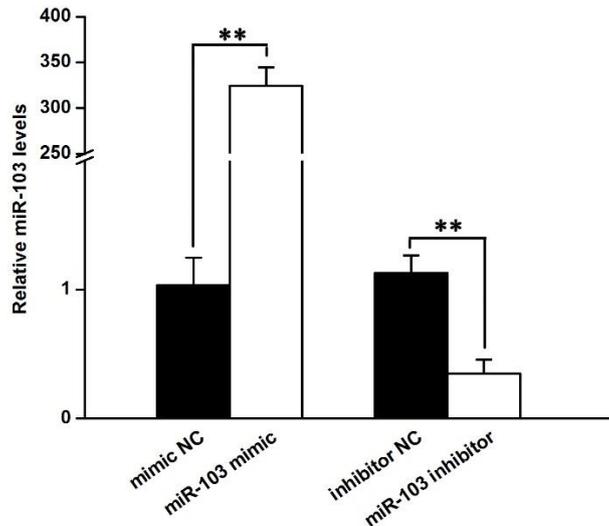


图 3-6 在成骨细胞上验证 miR-103 mimic 和 inhibitor 的作用效果

Figure 3-6 qRT-PCR analysis of miR-103 levels in MC3T3-E1 cells after treated with miR-103 mimic, miR-103 inhibitor or their negative controls (mimic NC and inhibitor NC). The experiment was performed in triplicate and data are the average of three independent experiments. The results were expressed as the mean \pm s.d. with two-tailed Student's *t* test against control samples. $^{**}P < 0.01$ compared with negative control.

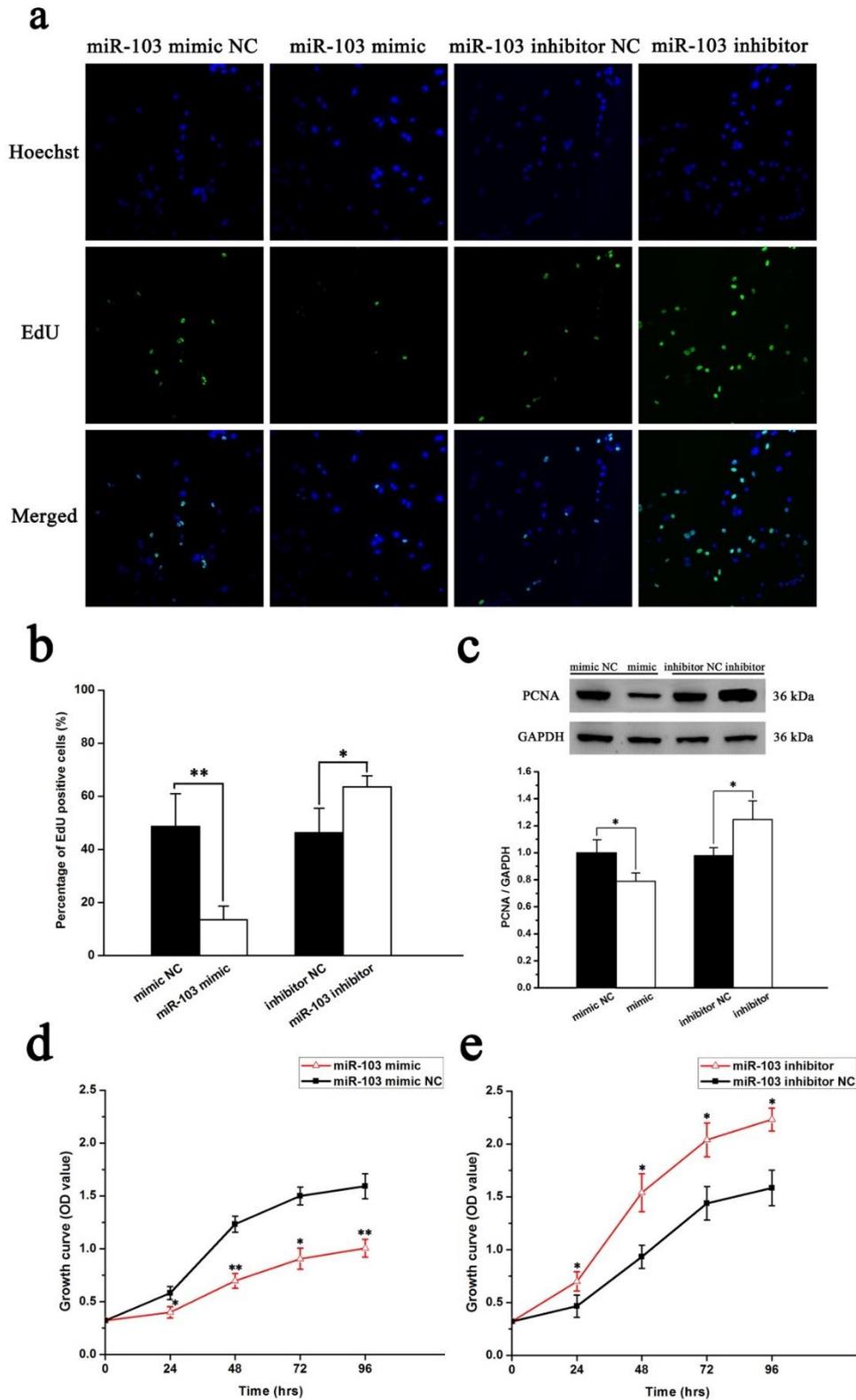


图 3-7 模拟失重环境下 miR-103 对成骨细胞增殖的影响

Figure 3-7 miR-103 inhibits osteoblasts proliferation under the condition of simulated microgravity. miR-103 mimic or miR-103 inhibitor was transfected into

MC3T3-E1 cells before treating the cells with 48 h simulated microgravity. (a) EdU incorporation assay was analyzed by confocal microscopy. Proliferating MC3T3-E1 cells were labeled with EdU. Staining of MC3T3-E1 cells with the nucleic acid dye Hoechst (blue) and EdU (green), respectively. (b) Histogram showing average data for the percentage of EdU positive cells from different groups. The EdU incorporation rate was expressed as the ratio of EdU positive cells to total Hoechst positive cells ($n = 3$). (c) Western blot analyzes the expression of PCNA in the cells under the condition of simulated microgravity. The total protein loaded per lane was 40 μg ; detection of GAPDH on the same blots was used to verify equal loading amongst the various lanes (upper). Histogram showing average data for the relative expression of PCNA present in the cells from each group quantified by camera-based detection of emitted chemiluminescence (lower) ($n = 3$). Then, the cells from miR-103 mimic group (b) or inhibitor group (c) were seeded on 96-well plates at a density of 5,000 cells/well, respectively. Cell proliferation was evaluated by a WST-8 assay up to 96 h ($n = 3$). The results were expressed as the mean \pm s.d. with two-tailed Student's *t* test against control samples. $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$, compared with stationary control.

3.6 在模拟失重环境下 miR-103 抑制成骨细胞的增殖是 Cav1.2 依赖的

为了进一步验证 miR-103 在模拟失重环境下对成骨细胞增殖的调控机制，我们将 miR-103 mimic 或 inhibitor 和 Cav1.2 siRNA 共转染到 MC3T3-E1 中，而后检测成骨细胞增殖能力的变化。

由于 CCK-8 检测增殖的耗时较长，我们重新选定合适的 Cav1.2 siRNA 转染浓度和时间以达到更好的沉默效率。Western blotting 结果显示，在正常重力环境下转染 48 h 后，siRNA 对 Cav1.2 的沉默效率在 70% 左右，在 96 h 时 siRNA 沉默效率在 60% 左右 ($P < 0.05$ ，图 3-8a)。这表明，在后续进行成骨细胞增殖检测时 (96 h 左右)，Cav1.2 的蛋白表达可以得到很好地抑制。随后，我们将 miR-103 mimic 或 inhibitor 和 Cav1.2 siRNA 的阴性对照共转染到 MC3T3-E1 中，在模拟失重环境下检测增殖能力的变化。结果发现，Cav1.2 siRNA 的阴性对照对 miR-103 mimic 或 inhibitor 在成

骨细胞增殖的作用无显著影响,此时 miR-103 mimic 或 inhibitor 对成骨细胞增殖的作用趋势与图 3-7 (d 和 e) 一致 ($P < 0.05$, 图 3-8b 和 c)。然而, 当将 miR-103 mimic 或 inhibitor 和 Cav1.2 siRNA 共转染到 MC3T3-E1 后, 无论是 miR-103 mimic 组还是 inhibitor 组, 在模拟失重条件下成骨细胞的增殖均无显著改变 (图 3-8d 和 e)。结果提示, 在模拟失重环境下 miR-103 对成骨细胞增殖的影响是 Cav1.2 依赖的。

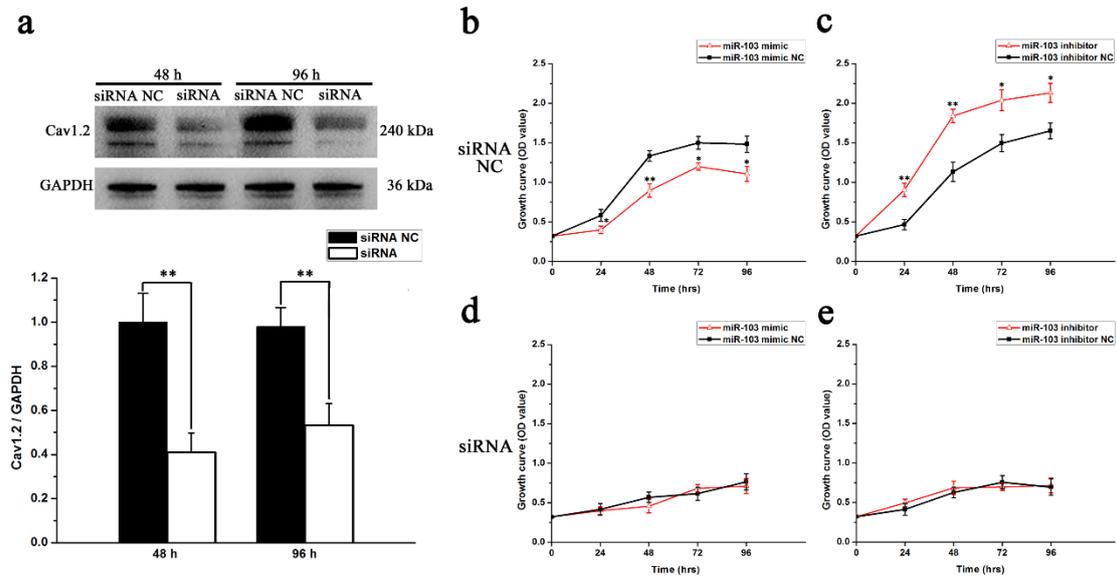


图 3-8 在模拟失重环境下 miR-103 对成骨细胞增殖的影响是 Cav1.2 依赖的

Figure 3-8 The inhibitory effect of miR-103 oligos on osteoblast proliferation under simulated microgravity condition was completely blocked when co-transfected miR-103 mimic or inhibitor with Cav1.2 siRNA. (a) In normal gravity condition, MC3T3-E1 cells were transfected with Cav1.2 siRNA and Cav1.2 siRNA NC (100 nM), followed by postincubation for 48 and 96 h. Western analysis indicates the magnitude and duration of Cav1.2 subunit suppression ($n = 3$). MiR-103 mimic (b) or miR-103 inhibitor (c) was co-transfected with Cav1.2 siRNA NC into MC3T3-E1 cells before treating the cells with 48 h simulated microgravity. Similarly, miR-103 mimic (d) or miR-103 inhibitor (e) was co-transfected with Cav1.2 siRNA into MC3T3-E1 cells before treating the cells with 48 h simulated microgravity. Then, the cells were seeded on 96-well plates at a density of 5,000 cells/well. Cell proliferation was evaluated by a WST-8 assay at 24-96 h ($n = 3$). The results were expressed as the mean \pm s.d. with two-tailed Student's t test against control samples. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, compared with control.

4 讨论

在骨重建和骨代谢平衡过程中,机械刺激可以通过机械传递信号通路发挥核心调节作用^[158-160]。大量研究表明,长期的去负荷状态,例如长期卧床和暴露在失重环境下,将导致承重骨的骨质丢失,而增加机体的负荷状态能够促进骨质的生成^[1, 2, 161-163]。外界机械刺激能够促进成骨细胞的增殖和分化潜能,有研究报道,去负荷状态下成骨细胞增殖能力的降低在失重性骨质丢失中起到关键作用^[3, 143]。第二部分实验已经证实,模拟失重通过下调 Cav1.2 的表达抑制成骨细胞的增殖,但是对于模拟失重如何下调 Cav1.2 的表达从而降低 LTCCs 的功能进而抑制成骨细胞的增殖,具体机制尚不清楚。本部分实验发现,在模拟失重环境下 Cav1.2 基因蛋白出现差异表达,故推测可能存在转录后的调控机制;随后,在已报道的能够调控 Cav1.2 转录后调控因子 miRNAs 中,筛选出在模拟失重环境下发生表达变化的 miR-103,验证了在此特殊的无负荷环境下 miR-103 对 Cav1.2 靶向调控作用;此外,本研究还验证了 miR-103 在成骨细胞增殖中的调控作用,证实 miR-103 对成骨细胞增殖的调控是 Cav1.2 依赖的。

研究表明,多种因素参与 Cav1.2 的表达调控。在 GABA 能抑制性神经元细胞中,淀粉样前体蛋白能够通过下调 Cav1.2 的表达抑制神经元细胞 LTCCs 的功能^[17]。还有报道指出,在心肌细胞中钙离子-钙离子调节蛋白依赖的蛋白激酶 II (CaMKII) 通过下调 Cav1.2 的表达抑制心肌细胞 LTCCs 的电活动^[18]。除此之外,还有其他因素可以调控 Cav1.2 的表达,例如元素硒缺乏加重小鼠心肌细胞氧化应激水平,引起 Cav1.2 基因和蛋白水平的上调^[19]。有学者还发现,在 cAMP 处理 24 h 后细胞 Cav1.2 mRNA 和蛋白水平均增加^[19]。这些结果表明虽然处理因素不同,但是 Cav1.2 基因和蛋白为同向变化。然而,本实验发现在模拟失重环境下成骨细胞 MC3T3-E1 的 Cav1.2 基因水平上调,而 Cav1.2 蛋白水平下调。这表明,转录后调控机制可能参与到模拟失重环境下成骨细胞 Cav1.2 的调节过程。

miRNA 是一类非编码的小分子 RNA,能够在转录后水平调节基因的表达。最近研究表明,有 6 条经过荧光素酶报告基因方法验证过的 miRNAs 分别在不同的条件下调控 Cav1.2。miR-137 能够靶向调控 Cav1.2,从而调节神经再生和神经发育^[27]。也有报道证实,miR-1^[25, 26]通过作用于 Cav1.2 参与到心衰和房室传导阻滞的调控中。

除此之外, miR-328^[28], miR-145^[29], miR-155^[30]和 miR-103^[30]也被证明在 Cav1.2 的调控中发挥重要作用。虽然已经证实以上 6 条 miRNAs 均可以靶向调控 Cav1.2, 但是它们是否在模拟失重条件下的成骨细胞中发挥作用还未可知。为此, 我们先检测了在模拟失重条件下这 6 条 miRNAs 在成骨细胞中的表达变化情况, 结果表明只有 miR-103 表达升高, 其余 5 条 miRNAs 表达并无差异。这与之前学者报道一致, 即 miR-103 为力学敏感的 miRNA。其次, 为了进一步验证表达升高的 miR-103 能否在模拟失重条件下的成骨细胞中调控 Cav1.2 的表达, 我们将 miR-103 inhibitor 转染进成骨细胞后对 Cav1.2 的表达和 LTCCs 的电活动进行检测。结果表明, miR-103 inhibitor 能够部分恢复模拟失重对成骨细胞 Cav1.2 表达和 LTCCs 功能的抑制作用。Favereaux 等人^[30]也已经证实神经元细胞中上调 miR-103 抑制 Cav1.2 的表达, 下调 miR-103 促进 Cav1.2 的表达。miRNA 通过与靶 mRNA 的 3'UTR 区特定序列互补配对结合从而发挥对基因表达的转录后水平调控。miRNA 对 mRNA 的沉默作用主要通过以下方式: miRNA 降解 mRNA 片段, 使得 mRNA 表达减少; miRNA 截短 mRNA 多聚核苷酸 A 尾破坏 mRNA 的稳定性; miRNA 通过干扰核糖体降低 mRNA 翻译成蛋白的效率^[23, 24]。本实验中, 模拟失重上调 Cav1.2 mRNA 水平的同时下调 Cav1.2 蛋白表达, 这表明 miR-103 应是通过阻断 Cav1.2 mRNA 的翻译过程实现对 Cav1.2 的调控。除了上面提到的 miRNAs, 还有其他关于 Cav1.2 转录后水平调控的报道。最近研究表明 Cav1.2 存在一段内质网保留结构域, 此结构域位于 C 尾端的近端, Cav β 亚基能够调节蛋白酶体对 Cav1.2 的降解速率^[164]。Rougier 等人证实 Nedd4-1 能够促进新合成的 Cav1.2 通过蛋白酶体途径和溶酶体途径发生降解^[165]。

关于 Cav1.2 基因蛋白差异表达的机制, 除了 miRNAs 调控和泛素化途径外, 可能还存在其他机制。模拟失重对成骨细胞的负性调控机制目前尚不清楚, 且编码 Cav1.2 的基因 *Cacnalc* 由至少 55 个外显子构成, 其调控极为复杂。因此, 我们认为模拟失重应通过几种甚至更多机制上调 Cav1.2 mRNA。近年来研究表明, 一些极为活跃的转录调控因子, 如 CREB 和 NF-kappa B, 能够直接调控 *Cacnalc* 的转录^[166, 167]; 同时, 有报道证实, 模拟失重对 CREB 和 NF-kappa B 等重要的转录调控因子的调控机制极其复杂^[168-171]。综上, 关于 Cav1.2 基因蛋白差异表达的机制是复杂多样的, 但是本文主要关注近年来转录后调控的热点因子 miRNAs, 其他可能调控途径有待进一步研究。

miR-103 的以往研究表明, 它参与了慢性疼痛^[30]和肠上皮细胞的增殖^[172]。像其他 miRNAs 一样, miR-103 可高表达在多种肿瘤细胞上, 这意味着 miR-103 可能参与到肿瘤的发生过程^[173]。研究还发现, miR-103 能够促进脂肪细胞的分化从而进一步调节糖脂代谢的稳态^[174, 175]。虽然有一些 miRNAs 被证明能够调节成骨细胞某些特异性标志物的基因表达^[176-178], 但是关于 miR-103 对成骨细胞功能调控的报道只有一项。Zuo 等人^[179]报道, miR-103 通过靶向调节 Runx2 对成骨细胞的分化和矿化起到抑制效应。我们对 miR-103 在成骨细胞增殖中的调控特点研究进一步地丰富了 miR-103 对成骨细胞功能的调控作用。本研究结果表明, 在模拟失重环境下, miR-103 抑制成骨细胞的增殖。我们的结果也和 Liao 等人^[172]的研究一致, 他们报道 miR-103 通过靶向调控 CCNE1、CDK2 和 CREB1 抑制小肠上皮细胞的增殖。

本部分实验中也存在一些不足。首先, 我们没有对 Cav1.2 在模拟失重环境下基因蛋白差异表达的机制进行更为深入的探讨。其次, 能够调控 Cav1.2 的 miRNAs 很多, 我们只是在已经报道的 miRNAs 中选择 miR-103; 虽然 miR-103 对 Cav1.2 的靶向调控在其他处理因素下已采用荧光素酶报告基因系统验证, 但在模拟失重环境下我们只是应用 Western blotting 和膜片钳技术辅助验证 miR-103 对 Cav1.2 的靶向调控作用。最后, 由于 *Cacna1c* 全长在 8,000 bp 以上, 很难通过构建合适的质粒将这个功能片段过表达以开展研究, 所以在本研究中我们只是采用基因干扰技术证实 miR-103 对成骨细胞增殖的抑制作用是 Cav1.2 依赖的。

综上所述, 模拟失重通过上调 miR-103 下调成骨细胞 Cav1.2 的表达从而抑制 LTCCs 的电活动, 而在模拟失重环境下 miR-103 对成骨细胞增殖的调控主要是通过 Cav1.2 实现的。至此, 我们发现模拟失重通过 miR-103/Cav1.2 信号通路抑制成骨细胞的增殖。此项研究为失重对成骨细胞增殖的负性调控阐明了一个新机制, 也为进一步研究失重性骨质丢失的细胞学机制提供了一个新方向。

小 结

一、主要结果和结论

(一) 主要结果

1. 回转器模拟失重降低前成骨细胞 MC3T3-E1 的 EdU 染色阳性率、下调 PCNA 蛋白的表达和抑制细胞活性。
2. 模拟失重阻碍 Bay K8644 诱导的 MC3T3-E1 细胞内钙离子浓度增高和抑制 LTCCs 的电活动。
3. 模拟失重通过下调 MC3T3-E1 细胞 Cav1.2 的表达抑制 LTCCs 的功能。
4. 阻断 LTCCs 或下调 Cav1.2 的表达加剧模拟失重对 MC3T3-E1 细胞增殖的抑制作用。
5. 模拟失重上调 MC3T3-E1 细胞 Cav1.2 mRNA 的表达。
6. 模拟失重上调 MC3T3-E1 细胞 miR-103 的表达，且降低 miR-103 的表达能够部分对抗模拟失重对 MC3T3-E1 细胞 Cav1.2 表达和 LTCCs 电活动的抑制作用。
7. 在模拟失重环境下 miR-103 抑制 MC3T3-E1 细胞的增殖，且 miR-103 对 MC3T3-E1 细胞增殖的抑制作用是 Cav1.2 依赖的。

(二) 主要结论

回转模拟失重通过激活 miR-103/Cav1.2 信号通路抑制前成骨细胞 MC3T3-E1 的增殖。

二、创新点

研究首次证实：

1. 回转模拟失重抑制成骨细胞上 LTCCs 的功能。
2. 模拟失重上调成骨细胞 miR-103 的表达。
3. 模拟失重通过激活 miR-103/Cav1.2 信号通路抑制成骨细胞的增殖。

三、研究展望

本研究观察到模拟失重抑制成骨细胞的增殖能力，并对其可能机制进行初步探讨，发现 miR-103/Cav1.2 信号通路在模拟失重抑制成骨细胞增殖中发挥重要作用，但研究中存在一些问题尚未解决。

1. 我们采用的地面模拟失重设备为回转器，虽然它可以模拟失重，但和真实的失重状态毕竟不同。真实的失重条件下，miR-103/Cav1.2 信号通路在成骨细胞增殖中发挥是否还能发挥作用，有待进一步研究。

2. 我们只在小鼠的前成骨细胞系 MC3T3-E1 中进行了模拟失重对细胞增殖影响的机制探讨。虽然 MC3T3-E1 在增殖方面和人原代细胞有着很多相似性，但是我们还应在其他种属的细胞系、原代细胞甚至在体模型中进一步验证我们得到的结论。

3. 失重性骨质丢失过程中，成骨细胞的功能受限是主要原因，但成骨细胞的增殖、分化和矿化作为成骨的主要指标，增殖、分化和矿化是成骨细胞独立的生物学过程，但又相互作用和影响，我们应当在下一步的实验中将增殖、分化和矿化作为一个完整的成骨指标进行观察，进一步观察 miR-103/Cav1.2 信号通路在成骨细胞分化和矿化中的作用。

4. LTCCs 由孔道形成亚基 α_1 和辅助亚基 $\alpha_2\delta$ 和 β 组成，而这些亚基作为组成离子通道的一个整体，分别对通道的功能有着不同的影响。本实验只是对 LTCCs 中最重要的 Cav1.2 这个功能亚基进行观测，并没有涉及到其他的辅助亚基，下一步我们要对组成 LTCCs 的其他亚基进行研究。

5. 在验证模拟失重通过 LTCCs 实现对成骨细胞增殖的抑制作用的实验中，我们只是在模拟失重环境下抑制 LTCCs 的功能后进一步检测成骨细胞的增殖能力，并没有激活 LTCCs，下一步实验中我们需要找到合理的激活 LTCCs 的方法；另外，由于 LTCCs 的核心亚基 Cav1.2 的基因全长在 8,000 bp 以上，很难通过构建合适的质粒将这个功能片段过表达，我们希望在下一步实验中将 Cav1.2 在成骨细胞中完成过表达。

6. Cav1.2 在模拟失重环境下基因蛋白差异表达的机制需要进一步的探讨。

参考文献

- [1] Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int*, 1995, 57(5): 344-358.
- [2] Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 1992, 258(5082): 607-614.
- [3] Morey ER, Baylink DJ. Inhibition of bone formation during space flight. *Science*, 1978, 201(4361): 1138-1141.
- [4] Riggs BL, Khosla S, Melton LR. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res*, 1998, 13(5): 763-773.
- [5] Vico L, Collet P, Guignandon A, et al. Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts. *Lancet*, 2000, 355(9215): 1607-1611.
- [6] Landis WJ, Hodgens KJ, Block D, et al. Spaceflight effects on cultured embryonic chick bone cells. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(6): 1099-1112.
- [7] Yagodovsky VS, Triftanidi LA, Gorokhova GP. Space flight effects on skeletal bones of rats (light and electron microscopic examination). *Aviat Space Environ Med*, 1976, 47(7): 734-738.
- [8] Bergh JJ, Shao Y, Puente E, et al. Osteoblast Ca^{2+} permeability and voltage-sensitive Ca^{2+} channel expression is temporally regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D_3 . *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 290(3): C822-C831.
- [9] Bergh JJ, Shao Y, Akanbi K, et al. Rodent osteoblastic cells express voltage-sensitive calcium channels lacking a gamma subunit. *Calcif Tissue Int*, 2003, 73(5): 502-510.
- [10] Duncan RL, Akanbi KA, Farach-Carson MC. Calcium signals and calcium channels in osteoblastic cells. *Semin Nephrol*, 1998, 18(2): 178-190.
- [11] Liu R, Li W, Karin NJ, et al. Ribozyme ablation demonstrates that the cardiac subtype of the voltage-sensitive calcium channel is the molecular transducer of 1, 25-dihydroxyvitamin D_3 -stimulated calcium influx in osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 2000, 275(12): 8711-8718.

- [12] Iqbal J, Zaidi M. Molecular regulation of mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328(3): 751-755.
- [13] Guggino SE, Lajeunesse D, Wagner JA, et al. Bone remodeling signaled by a dihydropyridine- and phenylalkylamine-sensitive calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(8): 2957-2960.
- [14] Ritchie CK, Maercklein PB, Fitzpatrick LA. Direct effect of calcium channel antagonists on osteoclast function: alterations in bone resorption and intracellular calcium concentrations. *Endocrinology*, 1994, 135(3): 996-1003.
- [15] Li J, Duncan RL, Burr DB, et al. L-type calcium channels mediate mechanically induced bone formation in vivo. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(10): 1795-1800.
- [16] Walker LM, Publicover SJ, Preston MR, et al. Calcium-channel activation and matrix protein upregulation in bone cells in response to mechanical strain. *J Cell Biochem*, 2000, 79(4): 648-661.
- [17] Yamaguchi DT, Green J, Kleeman CR, et al. Characterization of volume-sensitive, calcium-permeating pathways in the osteosarcoma cell line UMR-106. *J Biol Chem*, 1989, 264(8): 4383-4390.
- [18] Ronkainen JJ, Hanninen SL, Korhonen T, et al. Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II represses cardiac transcription of the L-type calcium channel alpha(1C)-subunit gene (Ca_v1c) by DREAM translocation. *J Physiol*, 2011, 589(Pt 11):2669-2686.
- [19] Cui J, Zhong R, Chu E, et al. Correlation between oxidative stress and L-type calcium channel expression in the ventricular myocardia of selenium-deficient mice. *J Int Med Res*, 2012, 40(5): 1677-1687.
- [20] Wang XT, Nagaba S, Nagaba Y, et al. Cardiac L-type calcium channel alpha 1-subunit is increased by cyclic adenosine monophosphate: messenger RNA and protein expression in intact bone. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(7): 1275-1285.
- [21] Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, 431(7006): 350-355.
- [22] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [23] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.
- [24] Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79: 351-379.

- [25] Rau F, Freyermuth F, Fugier C, et al. Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(7): 840-845.
- [26] Zhang Y, Sun L, Zhang Y, et al. Overexpression of microRNA-1 causes atrioventricular block in rodents. *Int J Biol Sci*, 2013, 9(5): 455-462.
- [27] Guella I, Sequeira A, Rollins B, et al. Analysis of miR-137 expression and rs1625579 in dorsolateral prefrontal cortex. *J Psychiatr Res*, 2013, 47(9): 1215-1221.
- [28] Lu Y, Zhang Y, Wang N, et al. MicroRNA-328 contributes to adverse electrical remodeling in atrial fibrillation. *Circulation*, 2010, 122(23): 2378-2387.
- [29] Sadegh MK, Ekman M, Rippe C, et al. Deletion of Dicer in smooth muscle affects voiding pattern and reduces detrusor contractility and neuroeffector transmission. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35882.
- [30] Wang JG, Meng X, Han J, et al. Differential expressions of miRNAs in patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2012, 92(26): 1816-1819.
- [31] Favereaux A, Thoumine O, Bouali-Benazzouz R, et al. Bidirectional integrative regulation of Cav1.2 calcium channel by microRNA miR-103: role in pain. *EMBO J*, 2011, 30(18): 3830-3841.
- [32] Martinez ME, Del CM, Medina S, et al. Influence of skeletal site of origin and donor age on osteoblastic cell growth and differentiation. *Calcif Tissue Int*, 1999, 64(4): 280-286.
- [33] Gotoh Y, Hiraiwa K, Nagayama M. In vitro mineralization of osteoblastic cells derived from human bone. *Bone Miner*, 1990, 8(3): 239-250.
- [34] Voegelé TJ, Voegelé-Kadletz M, Esposito V, et al. The effect of different isolation techniques on human osteoblast-like cell growth. *Anticancer Res*, 2000, 20(5B): 3575-3581.
- [35] Pearce AI, Richards RG, Milz S, et al. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*, 2007, 13: 1-10.
- [36] Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, et al. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*, 1995, 17(4 Suppl): 125S-133S.
- [37] Washington JT, Schneiderman E, Spears R, et al. Biocompatibility and osteogenic potential of new generation endodontic materials established by using primary osteoblasts. *J Endod*, 2011, 37(8): 1166-1170.
- [38] Ecarot-Charrier B, Glorieux FH, van der Rest M, et al. Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol*, 1983, 96(3): 639-643.

- [39] Carpenter TO, Moltz KC, Ellis B, et al. Osteocalcin production in primary osteoblast cultures derived from normal and Hyp mice. *Endocrinology*, 1998, 139(1): 35-43.
- [40] Wang D, Christensen K, Chawla K, et al. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct *in vitro* and *in vivo* differentiation/mineralization potential. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(6): 893-903.
- [41] Billiau A, Edy VG, Heremans H, et al. Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob Agents Chemother*, 1977, 12(1): 11-15.
- [42] Heremans H, Billiau A, Cassiman JJ, et al. *In vitro* cultivation of human tumor tissues II morphological and virological characterization of three cell lines. *Oncology*, 1978, 35(6): 246-252.
- [43] Kumarasuriyar A, Murali S, Nurcombe V, et al. Glycosaminoglycan composition changes with MG-63 osteosarcoma osteogenesis *in vitro* and induces human mesenchymal stem cell aggregation. *J Cell Physiol*, 2009, 218(3): 501-511.
- [44] Pierschbacher MD, Dedhar S, Ruoslahti E, et al. An adhesion variant of the MG-63 osteosarcoma cell line displays an osteoblast-like phenotype. *Ciba Found Symp*, 1988, 136: 131-141.
- [45] Saldana L, Bensiamar F, Bore A, et al. In search of representative models of human bone-forming cells for cytocompatibility studies. *Acta Biomater*, 2011, 7(12): 4210-4221.
- [46] Li Y, Backesjo CM, Haldosen LA, et al. Species difference exists in the effects of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and its analogue 2-methylene-19-nor-(20S)-1,25-dihydroxyvitamin D_3 (2MD) on osteoblastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008, 112(1-3): 110-116.
- [47] Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, et al. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res*, 1987, 47(18): 4961-4966.
- [48] Demais V, Audrain C, Mabileau G, et al. Diversity of bone matrix adhesion proteins modulates osteoblast attachment and organization of actin cytoskeleton. *Morphologie*, 2014, 98(321): 53-64.
- [49] Yu L, van der Valk M, Cao J, et al. Sclerostin expression is induced by BMPs in human Saos-2 osteosarcoma cells but not via direct effects on the sclerostin gene promoter or ECR5 element. *Bone*, 2011, 49(6): 1131-1140.
- [50] Keeting PE, Scott RE, Colvard DS, et al. Development and characterization of a rapidly proliferating, well-differentiated cell line derived from normal adult human osteoblast-like cells transfected with SV40 large T antigen. *J Bone Miner Res*, 1992, 7(2): 127-136.

- [51] Harris SA, Enger RJ, Riggs BL, et al. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res*, 1995, 10(2): 178-186.
- [52] Rochet N, Dubousset J, Mazeau C, et al. Establishment, characterisation and partial cytokine expression profile of a new human osteosarcoma cell line (CAL 72). *Int J Cancer*, 1999, 82(2): 282-285.
- [53] Martin TJ, Ingleton PM, Underwood JC, et al. Parathyroid hormone-responsive adenylate cyclase in induced transplantable osteogenic rat sarcoma. *Nature*, 1976, 260(5550): 436-438.
- [54] Forrest SM, Ng KW, Findlay DM, et al. Characterization of an osteoblast-like clonal cell line which responds to both parathyroid hormone and calcitonin. *Calcif Tissue Int*, 1985, 37(1): 51-56.
- [55] Hamedifar H, Salamat F, Saffarion M, et al. A Novel Approach for High Level Expression of Soluble Recombinant Human Parathyroid Hormone (rhPTH 1-34) in *Escherichia coli*. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2013, 5(3): 193-201.
- [56] Franceschi RT, Romano PR, Park KY. Regulation of type I collagen synthesis by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human osteosarcoma cells. *J Biol Chem*, 1988, 263(35): 18938-18945.
- [57] Wang X, Wang X, Tan Y, et al. Synthesis and evaluation of collagen-chitosan-hydroxyapatite nanocomposites for bone grafting. *J Biomed Mater Res A*, 2009, 89(4): 1079-1087.
- [58] Noda M. Transcriptional regulation of osteocalcin production by transforming growth factor-beta in rat osteoblast-like cells. *Endocrinology*, 1989, 124(2): 612-617.
- [59] Ng KW, Gummer PR, Michelangeli V P, et al. Regulation of alkaline phosphatase expression in a neonatal rat clonal calvarial cell strain by retinoic acid. *J Bone Miner Res*, 1988, 3(1): 53-61.
- [60] Ng KW, Hudson PJ, Power BE, et al. Retinoic acid and tumour necrosis factor-alpha act in concert to control the level of alkaline phosphatase mRNA. *J Mol Endocrinol*, 1989, 3(1): 57-64.
- [61] Jat P S, Sharp P A. Large T antigens of simian virus 40 and polyomavirus efficiently establish primary fibroblasts. *J Virol*, 1986, 59(3): 746-750.
- [62] Yamashita T, Asano K, Takahashi N, et al. Cloning of an osteoblastic cell line involved in the formation of osteoclast-like cells. *J Cell Physiol*, 1990, 145(3): 587-595.
- [63] Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, et al. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol*, 1983, 96(1): 191-198.
- [64] Wang D, Christensen K, Chawla K, et al. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast

- subclones with distinct *in vitro* and *in vivo* differentiation/mineralization potential. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(6): 893-903.
- [65] Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, et al. In search of an osteoblast cell model for *in vitro* research. *Eur Cell Mater*, 2012, 24: 1-17.
- [66] Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, et al. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an *in vitro* model of osteoblast development. *J Bone Miner Res*, 1992, 7(6): 683-692.
- [67] Hong D, Chen HX, Yu HQ, et al. Morphological and proteomic analysis of early stage of osteoblast differentiation in osteoblastic progenitor cells. *Exp Cell Res*, 2010, 316(14): 2291-2300.
- [68] Asai T, Suzuki H, Kitayama M, et al. The Long-term Effects of Red Light-emitting Diode Irradiation on the Proliferation and Differentiation of Osteoblast-like MC3T3-E1 Cells. *Kobe J Med Sci*, 2014, 60(1): E12-E18.
- [69] Yohay DA, Zhang J, Thraillkill KM, et al. Role of serum in the developmental expression of alkaline phosphatase in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Cell Physiol*, 1994, 158(3): 467-475.
- [70] Grigoriadis AE, Petkovich PM, Ber R, et al. Subclone heterogeneity in a clonally-derived osteoblast-like cell line. *Bone*, 1985, 6(4): 249-256.
- [71] Jahn K, Richards RG, Archer CW, et al. Pellet culture model for human primary osteoblasts. *Eur Cell Mater*, 2010, 20: 149-161.
- [72] 吕厚辰, 唐佩福. 胎球蛋白A在骨矿化早期的抑制作用. *解放军医学院学报*, 2013(01): 98-100.
- [73] McDonald F. Ion channels in osteoblasts: a story of two intracellular organelles. *Surgeon*, 2004, 2(2): 63-69.
- [74] Black JA, Waxman SG. Sodium channel expression: a dynamic process in neurons and non-neuronal cells. *Dev Neurosci*, 1996, 18(3): 139-152.
- [75] Pangalos M, Bintig W, Schlingmann B, et al. Action potentials in primary osteoblasts and in the MG-63 osteoblast-like cell line. *J Bioenerg Biomembr*, 2011, 43(3): 311-322.
- [76] Studer RA, Person E, Robinson-Rechavi M, et al. Evolution of the epithelial sodium channel and the sodium pump as limiting factors of aldosterone action on sodium transport. *Physiol Genomics*, 2011, 43(13): 844-854.
- [77] Gumz ML, Cheng KY, Lynch IJ, et al. Regulation of alphaENaC expression by the circadian clock

- protein Period 1 in mpkCCD (c14) cells. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799(9): 622-629.
- [78] Yang GZ, Nie HG, Lu L, et al. Estrogen regulates the expression and activity of epithelial sodium channel in mouse osteoblasts. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2011, 57 Suppl: L1480-L1486.
- [79] Vilasi A, Capasso G. Proteomics and tubulopathies. *J Nephrol*, 2010, 23 Suppl 16: S221-S227.
- [80] 卢丽, 吴亮, 陈珺, 等. 钠离子对成骨细胞的影响及其与上皮钠通道的关系. *南方医科大学学报*, 2011(11): 1871-1874.
- [81] Wang H, Mao Y, Zhang B, et al. Chloride channel ClC-3 promotion of osteogenic differentiation through Runx2. *J Cell Biochem*, 2010, 111(1): 49-58.
- [82] Wang H, Huo N, Li F, et al. Osteogenic role of endosomal chloride channels in MC3T3-E1 cells. *Mol Cell Biochem*, 2010, 342(1-2): 191-199.
- [83] Steinert M, Grissmer S. Novel activation stimulus of chloride channels by potassium in human osteoblasts and human leukaemic T lymphocytes. *J Physiol*, 1997, 500 (Pt 3): 653-660.
- [84] Brauer M, Frei E, Claes L, et al. Influence of K-Cl cotransporter activity on activation of volume-sensitive Cl⁻ channels in human osteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 285(1): C22-C30.
- [85] O'Neill WC. Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am J Physiol*, 1999, 276(5 Pt 1): C995-C1011.
- [86] Yang JY, Jung JY, Cho SW, et al. Chloride intracellular channel 1 regulates osteoblast differentiation. *Bone*, 2009, 45(6): 1175-1185.
- [87] Ke HZ, Qi H, Weidema AF, et al. Deletion of the P2X7 nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption. *Mol Endocrinol*, 2003, 17(7): 1356-1367.
- [88] Buckley KA, Wagstaff SC, McKay G, et al. Parathyroid hormone potentiates nucleotide-induced [Ca²⁺]_i release in rat osteoblasts independently of Gq activation or cyclic monophosphate accumulation. A mechanism for localizing systemic responses in bone. *J Biol Chem*, 2001, 276(12): 9565-9571.
- [89] Bowler WB, Dixon CJ, Halleux C, et al. Signaling in human osteoblasts by extracellular nucleotides. Their weak induction of the c-fos proto-oncogene via Ca²⁺ mobilization is strongly potentiated by a parathyroid hormone/cAMP-dependent protein kinase pathway independently of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 1999, 274(20): 14315-14324.

- [90] Liedert A, Kaspar D, Blakytyn R, et al. Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 349(1): 1-5.
- [91] Flockerzi V. An introduction on TRP channels. *Handb Exp Pharmacol*, 2007(179): 1-19.
- [92] Song MY, Yuan JX. Introduction to TRP channels: structure, function, and regulation. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 661: 99-108.
- [93] Benham CD, Davis JB, Randall AD. Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacology*, 2002, 42(7): 873-888.
- [94] Clapham DE. SnapShot: mammalian TRP channels. *Cell*, 2007, 129(1): 220.
- [95] Abed E, Moreau R. Importance of melastatin-like transient receptor potential 7 and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast-like cell proliferation. *Cell Prolif*, 2007, 40(6): 849-865.
- [96] Duncan R, Misler S. Voltage-activated and stretch-activated Ba^{2+} conducting channels in an osteoblast-like cell line (UMR 106). *FEBS Lett*, 1989, 251(1-2): 17-21.
- [97] Duncan RL, Kizer N, Barry EL, et al. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of a swelling-activated cation channel in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(5): 1864-1869.
- [98] Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem*, 1996, 65: 475-502.
- [99] Willecke K, Eiberger J, Degen J, et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *J Biol Chem*, 2002, 277(5): 725-737.
- [100] Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, et al. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev*, 2003, 83(4): 1359-1400.
- [101] Jiang JX, Siller-Jackson AJ, Burra S. Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress. *Front Biosci*, 2007, 12: 1450-1462.
- [102] Schiller PC, Roos BA, Howard GA. Parathyroid hormone up-regulation of connexin 43 gene expression in osteoblasts depends on cell phenotype. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(12): 2005-2013.
- [103] Ebihara L. New roles for connexons. *News Physiol Sci*, 2003, 18: 100-103.
- [104] Thimm J, Mechler A, Lin H, et al. Calcium-dependent open/closed conformations and interfacial energy maps of reconstituted hemichannels. *J Biol Chem*, 2005, 280(11): 10646-10654.
- [105] Jedamzik B, Marten I, Ngezahayo A, et al. Regulation of lens rCx46-formed hemichannels by

- activation of protein kinase C, external Ca^{2+} and protons. *J Membr Biol*, 2000, 173(1): 39-46.
- [106] Agre P, King LS, Yasui M, et al. Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol*, 2002, 542(Pt 1): 3-16.
- [107] Engel A, Stahlberg H. Aquaglyceroporins: channel proteins with a conserved core, multiple functions, and variable surfaces. *Int Rev Cytol*, 2002, 215: 75-104.
- [108] Mobasher A, Wray S, Marples D. Distribution of AQP2 and AQP3 water channels in human tissue microarrays. *J Mol Histol*, 2005, 36(1-2): 1-14.
- [109] Li GR, Deng XL, Sun H, et al. Ion channels in mesenchymal stem cells from rat bone marrow. *Stem Cells*, 2006, 24(6): 1519-1528.
- [110] Rezzonico R, Cayatte C, Bourget-Ponzio I, et al. Focal adhesion kinase pp125FAK interacts with the large conductance calcium-activated hSlo potassium channel in human osteoblasts: potential role in mechanotransduction. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(10): 1863-1871.
- [111] Ehrhardt AG, Frankish N, Isenberg G. A large-conductance K^+ channel that is inhibited by the cytoskeleton in the smooth muscle cell line DDT1 MF-2. *J Physiol*, 1996, 496 (Pt 3): 663-676.
- [112] Huang H, Rao Y, Sun P, et al. Involvement of actin cytoskeleton in modulation of Ca^{2+} -activated K^+ channels from rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neurosci Lett*, 2002, 332(2): 141-145.
- [113] Martin DK, Bootcov MR, Campbell TJ, et al. Human macrophages contain a stretch-sensitive potassium channel that is activated by adherence and cytokines. *J Membr Biol*, 1995, 147(3): 305-315.
- [114] Wu SN, Jan CR, Chiang HT. Fenamates stimulate BKCa channel osteoblast-like MG-63 cells activity in the human. *J Investig Med*, 2001, 49(6): 522-533.
- [115] Henney NC, Li B, Elford C, et al. A large-conductance (BK) potassium channel subtype affects both growth and mineralization of human osteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 297(6): C1397-C1408.
- [116] Weskamp M, Seidl W, Grissmer S. Characterization of the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ during hypotonic shock and the involvement of Ca^{2+} -activated K^+ channels in the regulatory volume decrease in human osteoblast-like cells. *J Membr Biol*, 2000, 178(1): 11-20.
- [117] Chesnoy-Marchais D, Fritsch J. Potassium currents and effects of vitamin D_3 metabolites and cyclic GMP in rat osteoblastic cells. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1148(2): 239-248.

- [118] Yellowley CE, Hancox JC, Skerry TM, et al. Whole-cell membrane currents from human osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int*, 1998, 62(2): 122-132.
- [119] Hughes S, Magnay J, Foreman M, et al. Expression of the mechanosensitive 2PK^+ channel TREK-1 in human osteoblasts. *J Cell Physiol*, 2006, 206(3): 738-748.
- [120] Rezzonico R, Schmid-Alliana A, Romey G, et al. Prostaglandin E2 induces interaction between hSlo potassium channel and Syk tyrosine kinase in osteosarcoma cells. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(5): 869-878.
- [121] Hernandez L, Park KH, Cai SQ, et al. The antiproliferative role of ERG K^+ channels in rat osteoblastic cells. *Cell Biochem Biophys*, 2007, 47(2): 199-208.
- [122] Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, et al. Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration. *Nature*, 1997, 386(6627): 855-858.
- [123] Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, et al. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology*, 1993, 32(11): 1075-1088.
- [124] Perez-Reyes E, Kim HS, Lacerda AE, et al. Induction of calcium currents by the expression of the alpha 1-subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature*, 1989, 340(6230): 233-236.
- [125] Gu X, Spitzer NC. Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca^{2+} transients. *Nature*, 1995, 375(6534): 784-787.
- [126] Reuter H. Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain. *Curr Opin Neurobiol*, 1996, 6(3): 331-337.
- [127] Black JA, Westenbroek RE, Catterall WA, et al. Type II brain sodium channel expression in non-neuronal cells: embryonic rat osteoblasts. *Brain Res Mol Brain Res*, 1995, 34(1): 89-98.
- [128] Arikath J, Campbell KP. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol*, 2003, 13(3): 298-307.
- [129] Hullin R, Khan IF, Wirtz S, et al. Cardiac L-type calcium channel beta-subunits expressed in human heart have differential effects on single channel characteristics. *J Biol Chem*, 2003, 278(24): 21623-21630.
- [130] Shao Y, Czymbek KJ, Jones PA, et al. Dynamic interactions between L-type voltage-sensitive

- calcium channel Cav1.2 subunits and ahnak in osteoblastic cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 296(5): C1067-C1078.
- [131] Caffrey JM, Farach-Carson MC. Vitamin D₃ metabolites modulate dihydropyridine-sensitive calcium currents in clonal rat osteosarcoma cells. *J Biol Chem*, 1989, 264(34): 20265-20274.
- [132] Caffrey JM, Brown AM, Schneider MD. Mitogens and oncogenes can block the induction of specific voltage-gated ion channels. *Science*, 1987, 236(4801): 570-573.
- [133] Meszaros JG, Karin NJ, Akanbi K, et al. Down-regulation of L-type Ca²⁺ channel transcript levels by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Osteoblastic cells express L-type alpha1C Ca²⁺ channel isoforms. *J Biol Chem*, 1996, 271(51): 32981-32985.
- [134] Duncan RL, Kizer N, Barry EL, et al. Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of a swelling-activated cation channel in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(5): 1864-1869.
- [135] Gu Y, Preston MR, El HA, et al. Osteoblasts derived from load-bearing bones of the rat express both L- and T-like voltage-operated calcium channels and mRNA for alpha 1C, alpha 1D and alpha 1G subunits. *Pflugers Arch*, 1999, 438(4): 553-560.
- [136] Ertel SI, Ertel EA, Clozel JP. T-type Ca²⁺ channels and pharmacological blockade: potential pathophysiological relevance. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1997, 11(6): 723-739.
- [137] Patton AJ, Genever PG, Birch MA, et al. Expression of an N-methyl-D-aspartate-type receptor by human and rat osteoblasts and osteoclasts suggests a novel glutamate signaling pathway in bone. *Bone*, 1998, 22(6): 645-649.
- [138] Hinoi E, Fujimori S, Takemori A, et al. Demonstration of expression of mRNA for particular AMPA and kainate receptor subunits in immature and mature cultured rat calvarial osteoblasts. *Brain Res*, 2002, 943(1): 112-116.
- [139] Mason DJ. Glutamate signalling and its potential application to tissue engineering of bone. *Eur Cell Mater*, 2004, 7: 12-25.
- [140] 王攀, 张舒, 王冰, 等. 模拟失重对MG-63细胞形态、增殖及周期的影响. *航天医学与医学工程*, 2007(06): 406-409.
- [141] Wimalawansa SM, Wimalawansa SJ. Simulated weightlessness-induced attenuation of testosterone production may be responsible for bone loss. *Endocrine*, 1999, 10(3): 253-260.

- [142] Buravkova LB, Romanov YA. The role of cytoskeleton in cell changes under condition of simulated microgravity. *Acta Astronaut*, 2001, 48(5-12): 647-650.
- [143] Wronski TJ, Morey ER. Effect of spaceflight on periosteal bone formation in rats. *Am J Physiol*, 1983, 244(3): R305-R309.
- [144] Zerath E, Holy X, Roberts SG, et al. Spaceflight inhibits bone formation independent of corticosteroid status in growing rats. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(7): 1310-1320.
- [145] Pardo SJ, Patel MJ, Sykes MC, et al. Simulated microgravity using the Random Positioning Machine inhibits differentiation and alters gene expression profiles of 2T3 preosteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288(6): C1211-C1221.
- [146] Mcallister TN, Frangos JA. Steady and transient fluid shear stress stimulate NO release in osteoblasts through distinct biochemical pathways. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(6): 930-936.
- [147] Genetos DC, Geist DJ, Liu D, et al. Fluid shear-induced ATP secretion mediates prostaglandin release in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(1): 41-49.
- [148] Chen NX, Geist DJ, Genetos DC, et al. Fluid shear-induced NF-kappaB translocation in osteoblasts is mediated by intracellular calcium release. *Bone*, 2003, 33(3): 399-410.
- [149] Lieberherr M. Effects of vitamin D₃ metabolites on cytosolic free calcium in confluent mouse osteoblasts. *J Biol Chem*, 1987, 262(27): 13168-13173.
- [150] Bidwell JP, Carter WB, Fryer MJ, et al. Parathyroid hormone (PTH)-induced intracellular Ca²⁺ signalling in naive and PTH-desensitized osteoblast-like cells (ROS 17/2.8): pharmacological characterization and evidence for synchronous oscillation of intracellular Ca²⁺. *Endocrinology*, 1991, 129(6): 2993-3000.
- [151] Duncan RL, Hruska KA, Misler S. Parathyroid hormone activation of stretch-activated cation channels in osteosarcoma cells (UMR-106.01). *FEBS Lett*, 1992, 307(2): 219-223.
- [152] Yamaguchi DT, Green J, Kleeman CR, et al. Characterization of volume-sensitive, calcium-permeating pathways in the osteosarcoma cell line UMR-106-01. *J Biol Chem*, 1989, 264(8): 4383-4390.
- [153] Loza J, Marzec N, Simasko S, et al. Role of epidermal growth factor-induced membrane depolarization and resulting calcium influx in osteoblastic cell proliferation. *Cell Calcium*, 1995, 17(4): 301-306.

- [154] Carpio LC, Stephan E, Kamer A, et al. Sphingolipids stimulate cell growth via MAP kinase activation in osteoblastic cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1999, 61(5): 267-273.
- [155] Zayzafoon M. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation. *J Cell Biochem*, 2006, 97(1): 56-70.
- [156] Madgwick S, Levasseur M, Jones KT. Calmodulin-dependent protein kinase II, and not protein kinase C, is sufficient for triggering cell-cycle resumption in mammalian eggs. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 17): 3849-3859.
- [157] Kahl CR, Means AR. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev*, 2003, 24(6): 719-736.
- [158] Hsieh YF, Turner C H. Effects of loading frequency on mechanically induced bone formation. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(5): 918-924.
- [159] Gross TS, Srinivasan S, Liu CC, et al. Noninvasive loading of the murine tibia: an in vivo model for the study of mechanotransduction. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(3): 493-501.
- [160] Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med*, 2007, 13(7): 791-801.
- [161] Bucaro MA, Fertala J, Adams CS, et al. Bone cell survival in microgravity: evidence that modeled microgravity increases osteoblast sensitivity to apoptogens. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1027:64-73.
- [162] Zwart SR, Pierson D, Mehta S, et al. Capacity of omega-3 fatty acids or eicosapentaenoic acid to counteract weightlessness-induced bone loss by inhibiting NF-kappaB activation: from cells to bed rest to astronauts. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(5): 1049-1057.
- [163] Rittweger J, Frost HM, Schiessl H, et al. Muscle atrophy and bone loss after 90 days' bed rest and the effects of flywheel resistive exercise and pamidronate: results from the LTBR study. *Bone*, 2005, 36(6): 1019-1029.
- [164] Altier C, Garcia-Caballero A, Simms B, et al. The Cavbeta subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nat Neurosci*, 2011, 14(2): 173-180.
- [165] Rougier JS, Albesa M, Abriel H, et al. Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4-1 (NEDD4-1) controls the sorting of newly synthesized Cav1.2 calcium channels. *J Biol Chem*, 2011, 286(11): 8829-8838.
- [166] Schulte JS, Seidl MD, Nunes F, et al. CREB critically regulates action potential shape and duration in the adult mouse ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 302(10): H1998-H2007.

- [167] Shi XZ, Pazdrak K, Saada N, et al. Negative transcriptional regulation of human colonic smooth muscle Cav1.2 channels by p50 and p65 subunits of nuclear factor-kappaB. *Gastroenterology*, 2005, 129(5): 1518-1532.
- [168] Wise KC, Manna SK, Yamauchi K, et al. Activation of nuclear transcription factor-kappaB in mouse brain induced by a simulated microgravity environment. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2005, 41(3-4): 118-123.
- [169] Boonyaratanakornkit JB, Cogoli A, Li CF, et al. Key gravity-sensitive signaling pathways drive T cell activation. *FASEB J*, 2005, 19(14): 2020-2022.
- [170] Sambandam Y, Townsend MT, Pierce JJ, et al. Microgravity control of autophagy modulates osteoclastogenesis. *Bone*, 2014, 61: 125-131.
- [171] Sharma CS, Sarkar S, Periyakaruppan A, et al. Simulated microgravity activates apoptosis and NF-kappaB in mice testis. *Mol Cell Biochem*, 2008, 313(1-2): 71-78.
- [172] Liao Y, Lonnerdal B. Global microRNA characterization reveals that miR-103 is involved in IGF-1 stimulated mouse intestinal cell proliferation. *PLoS One*, 2010, 5(9): e12976.
- [173] Weber DG, Johnen G, Bryk O, et al. Identification of miRNA-103 in the cellular fraction of human peripheral blood as a potential biomarker for malignant mesothelioma--a pilot study. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30221.
- [174] John E, Wienecke-Baldacchino A, Liivrand M, et al. Dataset integration identifies transcriptional regulation of microRNA genes by PPAR gamma in differentiating mouse 3T3-L1 adipocytes. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(10): 4446-4460.
- [175] Wilfred BR, Wang WX, Nelson PT. Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab*, 2007, 91(3): 209-217.
- [176] Hassan MQ, Gordon JA, Beloti MM, et al. A network connecting Runx2, SATB2, and the miR-23a~27a~24-2 cluster regulates the osteoblast differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(46): 19879-19884
- [177] Zhang Y, Xie RL, Croce CM, et al. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(24): 9863-9868.

- [178] Eskildsen T, Taipaleenmaki H, Stenvang J, et al. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(15): 6139-6144.
- [179] Zuo B, Zhu J, Li J, et al. microRNA-103a functions as a mechanosensitive microRNA to inhibit bone formation through targeting Runx2. *J Bone Miner Res*, 2015, 30(2): 330-345

个人简历和研究成果

1. 个人简历

孙中洋，男，1988年9月出生，江苏徐州人，汉族，中共党员。

2007年9月—2012年7月 第四军医大学航空航天医学系学员三队，本科生

2012年9月—2015年7月 第四军医大学研究生管理大队，硕士研究生

2. 发表论文情况

- 1) Sun Z, Cao X, Zhang Z, et al. Simulated microgravity inhibits L-type calcium channel currents partially by up-regulation of miR-103 in MC3T3-E1 osteoblasts. *Sci Rep*, 2015, 5: 8077 doi: 10.1038/srep08077. [IF (2013): 5.078].
- 2) Sun Z, Cao X, Hu Z, et al. MiR-103 inhibits osteoblasts proliferation mainly through decreasing expression of Cav1.2 in simulated microgravity. *Bone*, 2015, 76: 121-128. [IF (2013): 4.461].
- 3) 孙中洋, 李东韬, 张舒. 成骨细胞钾、钙离子通道的研究进展. 《解放军医学院学报》. 2014, 35(2): 186-189.
- 4) 孙中洋, 李东韬, 赵学武等. 成骨细胞钾离子和钙离子通道以外离子通道的研究进展. 《解放军医学院学报》. 2014, 35(4): 395-398.
- 5) 孙中洋, 张涵, 石菲等. 模拟失重对前成骨细胞 MC3T3-E1 内钙离子浓度的影响. 《西北国防医学杂志》. 2014, 35(2): 104-108.
- 6) 孙中洋, 李东韬, 赵学武等. 成骨细胞体外培养模型的研究进展. 《中国骨质疏松杂志》. 2015, 21(6): 105-109.

3. 发表会议摘要情况

硕士期间，参加国际国内学术会议4次，发表大会摘要6篇。其中，2014年在中国空间科学学会空间生命专业委员会第二十届学术研讨会中获得优秀墙报奖；2015年在第十五届国际骨质疏松研讨会暨第十三届国际骨矿研究学术会议上做大会报告。

4. 专著

参编《航空航天医学史》，张舒主编，2013年12月第一版，第四军医大学出版社。

5. 专利

获得专利申请号（201520022571.5）。发明名称：一种适应不同 Western 剪膜抗体孵育盒。

6. 获得奖励

- 1) 2012年获得“优秀学员”称号；
- 2) 2013年获得硕士研究生三等等奖学金；
- 3) 2014年获得“优秀研究生”称号；
- 4) 2015年获得硕士研究生一等奖学金。

致 谢

感谢恩师！从一名青涩的本科生到成为一名即将毕业的硕士生，在这充实三年研究生生活里，我的每一点足迹上都镌刻着导师的悉心指导和栽培。我是极其幸运的，导师张舒教授和谢满江副教授是我从事科研的启蒙者，他们孜孜不倦的工作状态、严谨求实的治学态度、精益求精的做事理念、高屋建瓴的科学思维和笃定坚实的科学信仰成为我终身努力的导航；辅导老师曹新生副教授在科研上为我扶梯搭桥、在学习上为我引路指航，在生活上为我解惑疏难。在他们的关怀和指导下，我的三年学习生活充实而顺利，他们对我的言传身教定会使我终身受益，也将成为我研究生生活中最为宝贵的人生财富。我的点滴成长无不浸透着他们的殷殷心血和切切期盼。谨此献上学生最崇高的敬意和最诚挚的感激！

衷心感谢航空航天生物动力学教研室的全体老师和同学对我无私的帮助、关怀、鼓励和指导。原教研室主任孙喜庆教授对人亲切和善、对工作尽心尽职、对科研严谨求实，为研究生搭建了广阔的实验平台。感谢杨长斌副教授、王永春副教授、石菲讲师、高原讲师、赵疆东助理实验师、胡泽兵博士生、陈荣贵硕士、张连昌硕士生、王瀚硕士生和周骅硕士生，他们在我课题思路设计、实验操作技能、结果整理判别等方面提供了宝贵的建议和经验，使得课题得以顺利进行，同时在学习和生活中他们也成为我的良师益友。

衷心感谢航空航天生理学教研室的全体老师和同学对我无私接纳和帮助。他们不仅为我提供的良好实验平台，他们身上的许多优点值得我去学习，与他们之间的相处、合作以及交流使我收获颇多。特别感谢张琳老师、刘焕老师、王忠超博士生、岳志杰博士生、杜成博士生、陈励硕士生、吕强硕士生在我完成课题的过程中给予的全力支持和大力帮助。

衷心感谢预防医学系劳动卫生教研室的曹子鹏老师对我提供的无私帮助和指导，在我实验遇到困难时，他认真分析问题，为我指明了方向。还要感谢预防医学系劳动卫生教研室为我提供的实验平台和技术支持。衷心感谢生物化学教研室的张健副教授、李霞副教授和徐欣元硕士生在文章修改、思路探讨和技术支持上提供的

大力帮助。同时，感谢唐都医院神经内科的张卓老师在质粒获取和文章修改上给予的帮助和指导。感谢新加坡国立大学的 Tuck Wah Soong 教授和 Liao Ping 教授在课题上的帮助。我还要感谢药理学教研室郭艳艳实验员、张鷟硕士生在膜片钳技术等操作上提供的热情帮助和指导。

衷心感谢我亲密的同学和战友，他们是窦建平硕士生、严伟明硕士生、程耀平硕士生、吴迪硕士生、程珊硕士生、张敏龙硕士生、马奔硕士生、赵再华硕士生、康贝佩硕士生、董颖硕士生、张倩硕士生、宋晗博士生、蔡文斌硕士生、争鸣硕士生、玉夕硕士生、叶传涛硕士生、赵海卫硕士生、张哲硕士生、高博硕士生、黄强博士生、崔龙彪博士生和张涵实验员，他们不仅在科研上予以无私的帮助，生活中更是有他们一路同行，感谢你们的陪伴和支持。

最后衷心感谢我的爱人裴晓桐和我的家人在生活上给予我的理解、鼓励和默默帮助，他们的无私奉献、关心和支持是我前进的不竭动力。