

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.41.004 [http://www.crter.org]

仲兴, 张德志, 韩鸿宾, 李凯, 杨智洋, 付文举. 地塞米松诱导成骨细胞凋亡的蛋白激酶C途径[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(41):7205-7212.

地塞米松诱导成骨细胞凋亡的蛋白激酶C途径*

仲兴¹, 张德志², 韩鸿宾³, 李凯⁴, 杨智洋¹, 付文举¹ (1辽宁医学院, 辽宁省锦州市 121001; 2辽宁医学院附属第一医院骨关节科, 辽宁省锦州市 121001; 3北京大学医学部科研处, 北京市 100191; 4北京大学医学部, 北京市 100191)

文章亮点:

1 地塞米松影响骨内成骨细胞的分化和活性, 通过加强细胞凋亡以及抑制细胞周期降低成骨细胞的数量, 所以要想改善地塞米松的不良反应需要干预地塞米松对成骨细胞的影响。

2 蛋白激酶C是磷脂依赖钙激活的蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶, 是多种细胞信号传导通路中的主要因子。蛋白激酶C参与调控细胞周期, 并对细胞的生长与凋亡起调节作用。

3 实验结果显示, 地塞米松诱导成骨细胞凋亡的机制之一是增强蛋白激酶C的活性, 所以阻止蛋白激酶C的传导是抑制地塞米松不良反应的一种方法。

关键词:

组织构建; 骨组织构建; 蛋白激酶C途径; 成骨细胞; 地塞米松; 凋亡; 糖皮质激素

主题词:

成骨细胞; 地塞米松; 骨和骨组织; 蛋白激酶C; 佛波醇类; 动力传导, 细胞

摘要

背景: 地塞米松以增加细胞周期时间的方法提高细胞凋亡来减少成骨细胞和骨细胞的数量。蛋白激酶C是细胞内信号传导通路的一种, 与细胞凋亡有关已有相关文献报道。

目的: 探讨地塞米松诱导成骨细胞凋亡在蛋白激酶C细胞内信号转导途径方向的机制。

方法: 取胎鼠骨髓间充质干细胞进行成骨诱导, 分为塞米松模型组、佛波醇组和星型胞菌素组。地塞米松模型组加入 1×10^{-6} mol/L 地塞米松, 佛波醇组加入 1×10^{-6} mol/L 地塞米松和 1×10^{-7} mol/L 佛波醇, 星型胞菌素组加入 1×10^{-6} mol/L 地塞米松和 1×10^{-7} mol/L 星型胞菌素, 观察不同于干预组细胞的增殖或抑制, 并对细胞膜及细胞质中蛋白激酶C含量的变化进行检测。

结果与结论: 地塞米松可明显的诱导凋亡, 加入佛波醇后凋亡明显增加, 加入星形胞菌素后凋亡明显减少。加入地塞米松后胞浆的蛋白激酶C明显减少, 包膜明显增加。加入地塞米松不同时间, 胞浆和胞膜的蛋白激酶C变化在30 min最明显。说明地塞米松诱导成骨细胞凋亡的机制与蛋白激酶C有关, 地塞米松为蛋白激酶C激动剂。细胞受到刺激后, 胞浆的蛋白激酶C转移至包膜, 胞浆中的蛋白激酶C量减少, 包膜中的增加。

Mechanism of osteoblast apoptosis induced by dexamethasone via the protein kinase C pathway

Zhong Xing¹, Zhang De-zhi², Han Hong-bin³, Li Kai⁴, Yang Zhi-yang¹, Fu Wen-ju¹ (1Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China; 2Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China; 3Department of Scientific Research, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China; 4Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China)

Abstract

BACKGROUND: Dexamethasone can improve the cell apoptosis and decrease the number of osteoblasts and bone cells through increasing the time of cell cycle. Protein kinase C is a kind of intracellular signal transduction pathways, and there are related reports on the relationship between protein kinase C and cell apoptosis.

OBJECTIVE: To investigate the mechanism of dexamethasone-induced osteoblast apoptosis via protein kinase C intracellular signal transduction pathway.

METHODS: Fetal rat bone marrow mesenchymal stem cells were collected for osteogenic induction, and the cells were divided into dexamethasone group, phorbol group and star cytochalasin group. The cells in the dexamethasone group were added with 1×10^{-6} mol/L dexamethasone, the cells in the phorbol group were added with 1×10^{-6} mol/L dexamethasone and 1×10^{-7} mol/L phorbol, while the cells in the star cytochalasin group were added with 1×10^{-6} mol/L dexamethasone and 1×10^{-7} mol/L star cytochalasin. The proliferation and inhibition of the cells in different intervention groups were observed, and the content of protein kinase C in the cell membrane and cytoplasm was measured.

RESULTS AND CONCLUSION: Dexamethasone could induce apoptosis significantly, and after added with

仲兴★, 男, 1987年生, 山东省兖州市人, 汉族, 辽宁医学院在读硕士, 主要从事骨组织工程方面的研究。

baobeilongdao@163.com

通讯作者: 张德志, 博士, 副主任医师, 辽宁医学院附属第一医院骨关节科, 辽宁省锦州市 121001
zdzh5@yahoo.com.cn

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2013)41-07205-08

收稿日期: 2013-01-03

修回日期: 2013-01-28

(20121003001/D - C)

Zhong Xing★, Studying for master's degree, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
baobeilongdao@163.com

Corresponding author: Zhang De-zhi, M.D., Associate chief physician, Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
zdzh5@yahoo.com.cn

Received: 2013-01-03

Accepted: 2013-01-28

phorbol, the apoptosis was increased significantly; while after added with star cytochalasin, the apoptosis was decreased significantly. After added with dexamethasone, the content of protein kinase C in the cytoplasm was significantly decreased, while increased in the cell membrane. At different time points after added with dexamethasone, the change of the content of protein kinase C in the cytoplasm and cell membrane was most significant at 30 minutes. The results indicated that mechanism of dexamethasone-induced osteoblast apoptosis was correlated with protein kinase C, and dexamethasone was the agonist of protein kinase C. After the cells were stimulated, the protein kinase C in the cytoplasm will moved to the cell membrane, and then the content of protein kinase C in the cytoplasm was decreased, while increased in the cell membrane.

Subject headings: osteoblasts; dexamethasone; bone and bones; protein kinase C; phorbols; mechanotransduction, cellular

Zhong X, Zhang DZ, Han HB, Li K, Yang ZX, Fu WJ. Mechanism of osteoblast apoptosis induced by dexamethasone via in the protein kinase C pathway. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(41):7205-7212.

0 引言 Introduction

股骨头坏死的特点是股骨头坏死组织缺血和骨微结构的恶化, 从而增加股骨头残疾和崩溃的风险^[1-2]。糖皮质激素是自然产生的类固醇激素或人工合成的化合物, 被广泛用于治疗炎症和自身免疫性疾病^[3]。外源性和内源性的糖皮质激素过剩主要的不良反应是骨质流失和骨质疏松症^[4], 导致骨折的风险增加^[4]。据报道长期糖皮质激素治疗可抑制骨微结构和骨组织的矿物密度^[5], 而约有一半的库欣综合征患者和1/3的患者长期服用糖皮质激素^[6-7], 由于骨质疏松导致低能量骨折, 发病后治疗几个月之内迅速增加骨折风险, 停药后迅速下降^[4]。相当多的证据表明, 糖皮质激素在人类和小鼠引起的骨质流失分两个阶段: 早期为快速流失的阶段, 由于过度的骨吸收和较慢骨重建, 后阶段骨量丢失是因骨形成不足^[8-10], 而后阶段是因为糖皮质激素的细胞毒性对成骨细胞的生成和活动的影 响^[10]。成骨细胞分化和骨形成的减值是糖皮质激素引起的骨质疏松症的主要解释^[11-12]。

长期类固醇治疗导致骨形成减少和骨质流失被认为是股骨头坏死有力的病因学^[13-15]。骨架可连续再生, 10年完成骨骼重塑, 重塑包括由破骨细胞去除老骨和由成骨细胞生成新骨^[16]。多数幸存的成骨细胞变成骨, 埋在骨基质, 其中可能发挥的协调作用进一步改造活动, 包括骨骼的修复微损伤^[17]。成骨细胞和/或骨细胞凋亡将危及骨骼的完整性, 骨质流失和脆弱性骨折的发病与糖皮质激素过剩^[18]。

骨重建中的这些变化可能与成骨细胞的数量减少和活性有关^[19]。糖皮质激素影响骨内成骨细胞的分化和活性^[4]。 1×10^{-7} mol/L地塞米松抑制成骨细胞分化和增殖, 在第7天诱导骨祖细胞MC3T3-E1细胞的凋亡^[3]。糖皮质激素通过类似抑制细胞周期提高细胞凋亡的方法减少成骨细胞和骨细胞的数量^[20-21]。骨细胞凋亡增加已在股骨头坏死临床研究中得到证实^[22-23]。实验研究发现糖皮质激素通过增加成骨细胞凋亡导

致股骨头坏死发生^[24-25]。对糖皮质激素诱导成骨细胞的凋亡机制的研究有利于揭示激素性骨坏死的发病过程。

糖皮质激素已被证明能抑制成骨细胞分化, 通过下调一些关键蛋白, 如生长激素, 胰岛素样生长因子 I 和 II, 碱性磷酸酶、I 型胶原、骨钙素、骨质素或通过某些蛋白质如MKP-1, 胶原酶1, 胶原酶3^[26]。地塞米松在其他信号通路涉及成骨细胞分化的影响可能是Krox20/EGR2, MPK-1, 转化生长因子 β -Smad, Camp/PKA, β -catenin^[27-35]。现在有文献报道蛋白激酶C与成骨细胞凋亡有关, 例如神经酰胺通过细胞内蛋白激酶C信号转导通路调节成骨细胞的存活和凋亡^[16], 甲状旁腺激素调节成骨细胞凋亡依赖环磷酸腺苷的PKA途径和依赖钙的蛋白激酶C途径^[36], 但目前没有关于地塞米松诱导成骨细胞凋亡在蛋白激酶C方向机制的报道。这次实验研究目的是探索地塞米松诱导成骨细胞凋亡的机制。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学体外观察。

时间及地点: 于2011年3至12月在北医三院科研楼中心实验室完成。

材料:

实验动物: 健康新生1 d内SD大鼠4只, 不分雌雄, 购自北京大学医学部动物实验中心, 实验过程中对动物的处置符合医学伦理学标准。

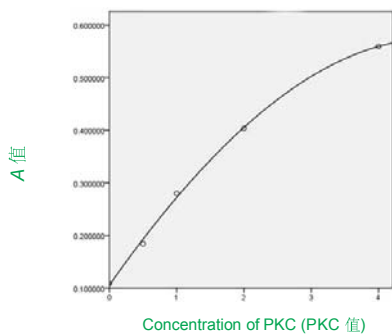
实验方法:

实验原理: 蛋白激酶C蛋白激酶C是一种细胞质酶, 在未受刺激的细胞中, 蛋白激酶C主要分布在细胞质中, 呈非活性构象。一旦有第二信使的存在, 蛋白激酶C将成为膜结合的酶, 它能激活细胞质中的酶, 参与生化反应的调控, 同时也能作用于细胞核中的转录因子, 参与基因表达的调控, 是一种多功能的酶。因此检验胞膜、胞质中的蛋白激酶C量的变化可反应蛋白激酶C是否参与细胞凋亡^[33]。

地塞米松诱导成骨细胞凋亡机制在蛋白激酶C途径实验的试剂、药品和设备:

试剂、药品和设备	来源
胎牛血清、F12培养基、	Gibco
I型胶原酶、胰酶、四环素、地塞米松、佛波醇、	Sigma
星型胞菌素及耗材、低温高速离心机、超声粉碎	
碎机	
茜素红、碱性磷酸酶试剂盒	南京建成生物工程公司
Annexin V-PE/7-AAD 凋亡检测试剂盒	凯基
大鼠蛋白激酶 C(PKC)酶联免疫分析试剂盒	RD 公司
MTT 试剂盒	invitrogen
超净工作台、恒温培养箱	Hen force
倒置显微镜	Leica
离心机	Beckman Allegra TM X-22
流式细胞仪	Guava
酶标仪	Thermo
PH 仪	Orion model
细胞计数仪	Chemomotec

制作标准曲线: 使用RD公司的大鼠蛋白激酶C试剂盒, 以标准浓度做横坐标, 以标准浓度测得的A值为纵坐标, 绘制标准曲线。依照试剂盒测取相关实验对象的A值, 求出蛋白激酶C的量。见图1。



注: 大鼠蛋白激酶C试剂盒给了6个标准浓度, 分别是0, 0.5, 1, 2, 4, 8 pmol/L, 得到6个A值, 实验得到标准曲线的公式: $y=0.106+0.182*x-0.015*x^2-0.001*x^3$ 。

图1 蛋白激酶C标准曲线图

Figure 1 Standard curve of protein kinase C

成骨细胞的培养: 成骨细胞的分离采用酶交替消化法。在超净台内将4只大鼠胎鼠浸泡于体积分数75%的乙醇5 min, 取出后放入培养皿中, 剥出颅骨, 剔除骨膜、血管和结缔组织, 放入PBS中浸泡。骨片剪碎, 用PBS冲洗3次, 冲洗干净。加入0.25%胰蛋白酶4 mL 消化5 min, 加入4 mL 含体积分数10%FBS的F12培养基终止消化, 去掉消化液; 加入0.1% I型胶原酶5 mL, 于37℃消化30 min, 收集消化液, 连续消化3次。用离心机1 000 r/min, 离心半径13.5 cm, 离心5 min, 弃去上清; 将沉淀移入培养瓶中, 加入培养基含体积分数

10% FBS的F12培养基4.5 mL, 倒置培养瓶于培养箱; 1 h后将培养瓶翻转过来。以后每3 d换培养液1次, 待生长细胞铺满平皿80%后, 进行传代, 取第3代做实验^[35]。

成骨细胞的鉴定: ①细胞形态观察相差显微镜下观察原代培养24 h、6 d及第2, 3代的成骨细胞的细胞形态。②茜素红染色: 茜素红配置用蒸馏水配置0.1%的茜素红溶液, 调节pH到7.2, 然后原代和第4代的细胞培养18 d以上即可染色。③染色方法: 先用PBS冲洗3次, 体积分数95%的乙醇固定10 min, 加入茜素红染液, 放入培养箱中30 min, 用PBS冲洗后即可。④碱性磷酸酶试剂盒检测细胞培养液中的碱性磷酸酶含量。

骨细胞凋亡模型: 选择生长良好的成骨细胞, 以细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 接种于25 cm的培养瓶中, 48 h后贴壁生长良好, 用药物剂量 $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 的地塞米松加入培养瓶中, 于72 h收集细胞, 检查凋亡比例。

激素性骨坏死的原理检测:

MTT检测: 第4代未干预细胞分空白组、地塞米松模型组、佛波醇组和星型胞菌素组, 每组5孔。以 8×10^3 细胞浓度接种于96孔板, 12 h后加药物, 24 h后加入 $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 的地塞米松, 于48 h后检查细胞活性。

流式细胞仪检测: 以细胞浓度为 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 接种于25 cm的培养瓶中, 48 h后地塞米松模型组加入 $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 地塞米松, 佛波醇组加入 $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 地塞米松和 $1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 佛波醇, 星型胞菌素组加入 $1 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 地塞米松和 $1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 星型胞菌素。空白组不再进行干预。加药72 h后流式细胞仪检测凋亡。

检测蛋白激酶C变化: 收集上述4组细胞, 加入1 mol/L蛋白激酶C提取液, 超声粉碎5次, 20 s/次, 100 000×g离心1 h, 上清为胞浆部分。在沉淀中加入1 mL含0.1% Triton100的蛋白激酶C提取液, 按上述方法超声粉碎, 4℃裂解30 min后离心(同上)。上清为含胞膜部分。根据浓度绘制曲线, 选择测试点为10, 30, 60 min进行测量。

主要观察指标: ①MTT检测观测各种药物对细胞增殖或抑制的影响。②流式细胞仪检测观测加入各种药物加入后对细胞增殖或抑制的影响。③检测蛋白激酶C变化观测加入各种药物后对细胞膜及细胞质中蛋白激酶C含量的变化。

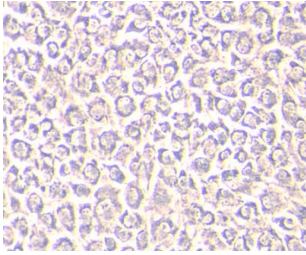
统计学分析: 第一作者统计, 采用SPSS 13.0统计软件进行处理, 采用t检验和单因素方差分析检验方法, 统计学软件来至于辽宁医学院。

2 结果 Results

2.1 SD大鼠成骨细胞形态观察

细胞生长状况: 接种后细胞悬浮, 1 h左右开始贴壁,

为单核、多边形及梭形, 生长旺盛期, 见图2。

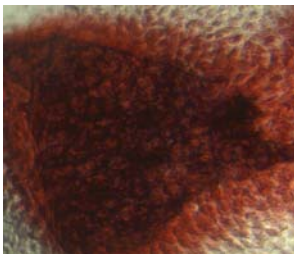


注: 图中细胞多伪足呈“铺路石”样排列, 带有粗大伪足; 细胞间无连接, 呈成骨系细胞特征, 胞质呈强嗜碱性。

图2 酶交替法获得的成骨细胞(倒置显微镜, $\times 100$)

Figure 2 Osteoblasts obtained with enzyme alternating method (Inverted microscope, $\times 100$)

成骨细胞在相差显微镜下表现为细胞体积较大, 呈鳞片状, 胞浆丰富, 多伪足呈“铺路石”样排列, 带有粗大伪足; 细胞间无连接, 呈成骨系细胞特征, 胞质呈强嗜碱性。胞浆内丰富的基质前体成分呈小的分散颗粒或小滴。随着代数的增加, 细胞体积逐渐增大, 细胞的状态到第6代时开始变差, 见图3。



注: 图中细胞体积较大, 呈鳞片状, 胞浆丰富, 多伪足呈“铺路石”样排列, 带有粗大伪足; 细胞间无连接, 呈成骨系细胞特征, 细胞质呈强嗜碱性。

图3 实验获得的成骨细胞倒置显微镜下观察(茜素红染色, $\times 100$)

Figure 3 Observation of osteoblasts obtained under inverted microscope (Alizarin red staining, $\times 100$)

茜素红染色: 成骨细胞连续培养30 d以上, 茜素红染色后出现钙结节, 结节红染色艳, 周围细胞淡色红染, 见图4。

碱性磷酸酶测试: 标准液的A值是 0.325 ± 0.021 , 实验所测细胞的A值是 0.162 ± 0.017 , 两组比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

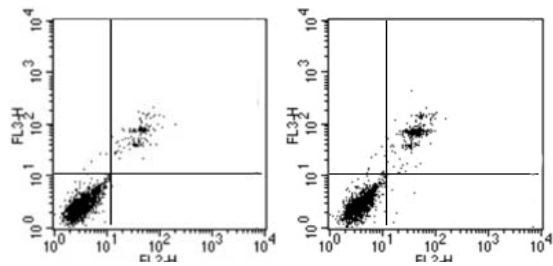


注: 可出现钙结节, 结节红染色艳, 周围细胞淡色红染。

图4 成骨细胞连续培养30 d 茜素红染色观察($\times 40$)

Figure 4 Observation of osteoblasts after cultured for 30 d with alizarin red staining ($\times 40$)

2.2 成骨细胞凋亡模型结果观察 加入 1×10^{-6} mol/L的地塞米松模型组72 h收集细胞, 细胞的凋亡明显比空白组增加, 细胞凋亡率为 $(18.627 \pm 3.756)\%$, 而空白组的凋亡率为 $(5.067 \pm 1.693)\%$, 两组比较, 差异有显著性意义($t=4.357$, $P < 0.05$)。见图5。



A: 空白组

B: 地塞米松模型组

注: 空白组细胞凋亡率为 $(5.067 \pm 1.693)\%$, 地塞米松模型组细胞凋亡率为 $(18.627 \pm 3.756)\%$, t 检验($t=4.357$, $P < 0.05$), 差异有显著性意义, 证明地塞米松模型组存在明显的凋亡。

图5 空白组和加入 1×10^{-6} mol/L 地塞米松干预的模型组细胞凋亡流式图

Figure 5 Apoptosis flow diagram of the control group and the model group induced with 1×10^{-6} mol/L dexamethasone

2.3 激素性骨坏死的原理检测结果

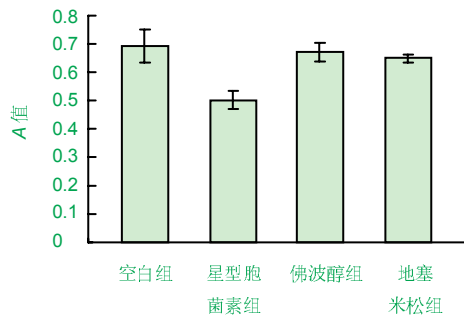
MTT检测: MTT法检测可以反应存活细胞的数目, 酶标仪检测A值与活细胞数成正比。空白组、地塞米松模型组、星型胞菌素组和佛波醇组的A值分别为 0.690 ± 0.098 , 0.502 ± 0.015 , 0.548 ± 0.016 , 0.543 ± 0.020 , 与空白组比较, 其他3组均降低, 差异有显著性意义($F=50.640$, $P < 0.01$)。但星型胞菌素与佛波醇组均高于地塞米松模型组, 见表1, 图6。

表 1 MTT 检测空白组、地塞米松模型组、佛波醇组和星型胞菌素组细胞活性(A)的方差分析

Table 1 Analysis of variance of the cell activity (absorbance value) in the blank control group, dexamethasone group, phorbol group and star cytochalasin group by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay

指标	组间变异	组内变异	总变异
平方和	0.061	0.003	0.064
自由度	3	8	11
均方和	0.020	0.000	
F值	50.640		
概率	0.000		

注: MTT 法检测空白组、地塞米松模型组、星型胞菌素组和佛波醇组细胞活性(A 值)分别为 0.690 342±0.097 623、0.502 042±0.015 278、0.547 827±0.016 384、0.5426 94±0.020 145, 单因素方差分析 $F=50.640$, $P < 0.01$ 。



注: 以 MTT 法检测空白组、地塞米松模型组、星型胞菌素组和佛波醇组细胞活性(A 值)分别为 0.690 342±0.097 623, 0.502 042±0.015 278, 0.547 827±0.016 384, 0.542 694±0.020 145, 单因素方差分析 $F=50.640$, $P < 0.01$ 。

图 6 空白组、地塞米松模型组、佛波醇组和星型胞菌素组的细胞活性 A 值

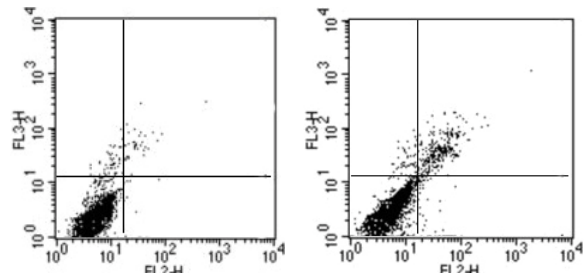
Figure 6 Cell activity (absorbance value) in the blank control group, dexamethasone group, phorbol group and star cytochalasin group

流式细胞仪检测: 空白组、地塞米松模型组、佛波醇组和星型胞菌素组的凋亡率分别为(5.067±1.693)%、(8.627±3.756)%、(25.653±2.480)%、(8.333±3.327)%。组间比较, 差异有显著性意义($F=20.451$, $P < 0.05$)。佛波醇组和星型胞菌素组明显低于地塞米松模型组。可见佛波醇和星型胞菌素可调节地塞米松诱导成骨细胞的凋亡, 佛波醇的凋亡率低于地塞米松模型组可能与佛波醇促进细胞增殖的作用有关, 见表2, 图7。

表 2 空白组、地塞米松模型组、佛波醇组和星型胞菌素组细胞凋亡率的方差分析

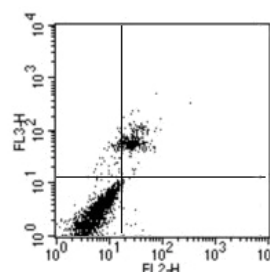
Table 2 Analysis of variance of cell apoptosis rate in the blank control group, dexamethasone group, phorbol group and star cytochalasin group

指标	组间变异	组内变异	总变异
平方和	524.499	68.390	592.889
自由度	3	8	11
均方和	174.833	8.549	
F值	20.451		
概率	0.000		

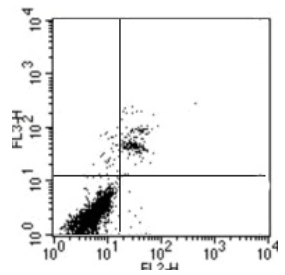


A: 空白组

B: 地塞米松模型组



C: 佛波醇组



D: 星型胞菌素组

注: 空白组细胞凋亡率为(5.067±1.693)%、地塞米松模型组细胞凋亡率为(18.627±3.756)%、佛波醇组细胞凋亡率为(25.653±2.480)%、星型胞菌素组细胞凋亡率(8.333±3.327)%。单因素方差分析($F=20.451$, $P < 0.054$), 说明佛波醇和星型胞菌素可调节地塞米松诱导成骨细胞的凋亡作用。

图 7 空白组、地塞米松模型组、佛波醇组和星型胞菌素组的凋亡流式图

Figure 7 Apoptosis flow diagrams of blank control group, dexamethasone group, phorbol group and star cytochalasin group

2.4 细胞胞浆与胞膜蛋白激酶C含量的变化 胞浆中的蛋白激酶C加入地塞米松10 min时降到最低, 30 min时与空白组持平, 60 min时高于空白组, 见表3。胞膜中10 min最高, 30 min时与空白持平, 60 min时低于空白, 见表4。

表 3 空白组及加入地塞米松干预后不同时间点细胞胞浆蛋白激酶 C 含量的测量

Table 3 Measurement of content of protein kinase C in cytoplasm of the blank control group and at different time points after induced with dexamethasone (A)

组别		第1次	第2次	第3次	平均值
空白组		0.165	0.164	0.179	0.169
加入地塞米松	10 min	0.153	0.151	0.153	0.152
	30 min	0.164	0.164	0.170	0.166
	60 min	0.167	0.167	0.167	0.167

注: 加入地塞米松 10 min 时细胞浆中的蛋白激酶 C 降到最低, 30 min 时与空白组持平, 60 min 时高于空白组。

表 4 空白组及加入地塞米松干预后不同时间点细胞胞膜蛋白激酶 C 含量的测量

Table 4 Measurement of content of protein kinase C in cell membrane of the blank control group and at different time points after induced with dexamethasone (A)

组别		第1次	第2次	第3次	平均值
空白组		0.155	0.155	0.159	0.156
加入地塞米松	10 min	0.177	0.173	0.180	0.177
	30 min	0.167	0.167	0.147	0.160
	60 min	0.158	0.155	0.157	0.157

注: 加入地塞米松后细胞膜中的蛋白激酶 C 10 min 为最高水平, 30 min 时与空白持平, 60 min 时低于空白。

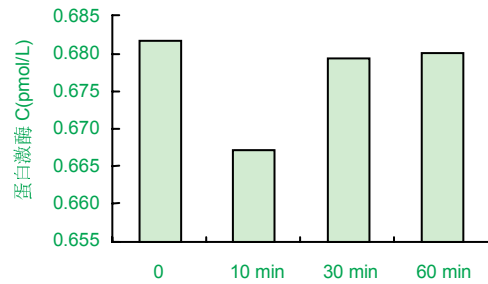
胞浆和胞膜数据方差分析, 见表5。根据数据可做一个图, 发现10 min时变化最大, 30 min时几乎恢复, 60 min时变化反而相反, 见图8。

表 5 空白组及加入地塞米松干预细胞胞浆、胞膜蛋白激酶 C 含量的方差分析

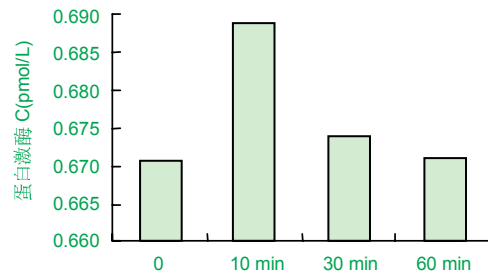
Table 5 Analysis of variance of content of protein kinase C in cytoplasm and cell membrane of the blank control group and at different time points after induced with dexamethasone

变异	细胞浆				概率
	平方和	自由度	均方和	F	
组间变异	0.001	3	0.000	8.347	0.008
组内变异	0.000	8	0.000		
总变异	0.001	11			

变异	胞膜				概率
	平方和	自由度	均方和	F	
组间变异	0.001	3	0.000	7.506	0.010
组内变异	0.000	8	0.000		
总变异	0.001	11			



A: 加入地塞米松后细胞胞浆蛋白激酶 C 的量随时间而发生的变化



B: 加入地塞米松后细胞膜蛋白激酶 C 的量随时间而发生的变化

注: 可见 10 min 时变化最大, 30 min 时基本与 0 时持平, 30-60 min 蛋白激酶 C 的量慢慢恢复到 0 min 水平。

图 8 胞浆和胞膜蛋白激酶 C 浓度随不同时间加入地塞米松的变化

Figure 8 Changes of contents of protein kinase C in the cytoplasm and membrane at different time points after induced with dexamethasone

3 讨论 Discussion

长期服用地塞米松可导致机体内源性和外源性的地塞米松剩余, 主要的不良反应为骨质流失和骨质疏松症^[3]。导致这些不良反应的原因是地塞米松抑制骨形成, 骨形成跟成骨细胞的数量和变化有关^[11-12, 19]。地塞米松影响骨内成骨细胞的分化和活性^[4], 降低成骨细胞的数量通过加强细胞凋亡以及抑制细胞周期^[20-21]。所以要想改善地塞米松的不良反应需要干预地塞米松对成骨细胞的影响。

实验得出结论地塞米松诱导成骨细胞凋亡的机制之一是增强蛋白激酶 C 的活性, 所以阻止蛋白激酶 C 的传导是一种治疗方法。蛋白激酶 C 是磷脂依赖钙激活的蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶, 是多种细胞信号传导通路中的主要因子。蛋白激酶 C 参与调控细胞周期, 并对细胞的生长与凋亡起调节作用。生理状态下细胞信号如激素、生长因子或神经递质等首先和细胞膜受体结合, 进而激

活G蛋白, 后者激活磷脂酶C, 水解磷脂肌醇4、5二磷酸产生二酯酰甘油(DAG)和肌醇1、4、5-三磷酸, 其中DAG是激活蛋白激酶C的主要胞内物质, 它可直接激活蛋白激酶C, 被激活的蛋白激酶C在转位到细胞膜后介导细胞增殖和分化、影响细胞周期和细胞凋亡、调节基因表达、控制神经传导等。

地塞米松导致成骨细胞凋亡的机制很多, 包括Krox20/EGR2, MPK-1, 转化生长因子 β -Smad, camp/PKA, β -catenin。目前细胞传导通路还不是很明确, 各传导通路之间互相影响, pkb跟蛋白激酶C之间的作用也不明确, 有时协同, 有时拮抗。所以蛋白激酶C只是机制中的一种, pka, pkb, 蛋白激酶C等各传导通路之间的关系有待进一步研究。

星型胞菌素与佛波醇为蛋白激酶C的调节剂, 实验中所得出结论为星型胞菌素降低地塞米松诱导成骨细胞的凋亡率, 佛波醇增加细胞的凋亡率。但肉眼可见佛波醇组的细胞生长活跃, 细胞数量增多。佛波醇促进细胞增殖但细胞凋亡增加, 最终成骨细胞的活着的数量增加还是减少还有待调查。

加入地塞米松后胞浆的蛋白激酶C明显减少, 胞膜明显增加; 蛋白激酶C蛋白的总量数据显示没有固定关系, 应该有蛋白激酶C蛋白的生成或消耗。但胞浆、胞膜都提示在加入地塞米松10 min时蛋白激酶C的变化最大, 30 min时几乎恢复到原始水平, 30-60 min期间慢慢恢复, 60min时超过原始水平。这说明细胞对地塞米松刺激受时间的影响, 细胞在一定时间后会自动减弱地塞米松刺激对自身的影响, 细胞可能有适应地塞米改变的机制。

细胞凋亡是指为维持内环境稳定, 由基因控制的细胞自主的有序的死亡。细胞凋亡与细胞坏死不同, 细胞凋亡不是一件被动的过程, 而是主动过程。细胞凋亡的特征是细胞由于降解酶, 主要是水解酶-蛋白酶与核酸酶的作用, 在近乎正常的细胞质膜内趋向死亡。有研究报道: 线粒体跨膜电位的耗散与细胞凋亡有密切关系, 在细胞凋亡过程中线粒体跨膜电位的耗散主要是由于线粒体内膜的通透性转变, 这是由于生成了动态的由多个蛋白质组成的位于线粒体内膜与外膜接触位点的通透性转变孔道, PT孔道开放导致细胞凋亡, 而PT孔道关闭能防止细胞凋亡。线粒体是细胞的能量中枢, 而蛋白激酶C的激活是需要耗能的, 抑制蛋白激酶C的激活可以减少细胞的耗能, 或许在能量方面双方会有一些的联系, 有待下一步的进展研究。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 第一至第六作者进行实施, 第二作者进行实验评估, 资料收集为第三、四、五、六作者, 第一作者成文, 第二作者审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组

织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 地塞米松导致成骨细胞凋亡的机制很多, 包括Krox20/EGR2, MPK-1, 转化生长因子 β -Smad, camp/PKA, β -catenin。目前细胞传导通路还不是很明确, 各传导通路之间互相影响, pkb跟蛋白激酶C之间的作用也不明确, 有时协同, 有时拮抗。所以蛋白激酶C只是机制中的一种, pka, pkb, 蛋白激酶C等各传导通路之间的关系有待进一步研究。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Pennington JM, Millar J, L Jones CP, et al. Simultaneous real-time amperometric measurement of catecholamines and serotonin at carbon fibre 'dident' microelectrodes. *J Neurosci Methods*. 2004;140(1-2):5-13.
- [2] Marciniak D, Furey C, Shaffer JW. Osteonecrosis of the femoral head. A study of 101 hips treated with vascularized fibular grafting. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(4):742-747.
- [3] Hong D, Chen HX, Yu HQ, et al. Quantitative proteomic analysis of dexamethasone-induced effects on osteoblast differentiation, proliferation, and apoptosis in MC3T3-E1 cells using SILAC. *Osteoporos Int*. 2011;22(7):2175-2186.
- [4] Kósa JP, Kis A, Bácsi K, et al. The protective role of bone morphogenetic protein-8 in the glucocorticoid-induced apoptosis on bone cells. *Bone*. 2011;48(5):1052-1057.
- [5] De Vries F, Bracke M, Leufkens HG, et al. Fracture risk with intermittent high-dose oral glucocorticoid therapy. *Arthritis & Rheumatism*. 2007;56(1):208-214.
- [6] Ross EJ, Linch DC. Cushing's syndrome-killing disease: discriminatory value of signs and symptoms aiding early diagnosis. *Lancet*. 1982;2(8299):646-9. PMID:125785
- [7] Adinoff AD, Hollister JR. Steroid-induced fractures and bone loss in patients with asthma. *N Engl J Med*. 1983;309(5):265-268.
- [8] LoCascio V, Bonucci E, Imbimbo B, et al. Bone loss in response to long-term glucocorticoid therapy. *Bone Miner*. 1990;8(1):39-51.
- [9] Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest*. 1998;102(2):274-282.
- [10] Zauli G, Rimondi E, Celeghini C, et al. Dexamethasone counteracts the anti-osteoclastic, but not the anti-leukemic, activity of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL). *J Cell Physiol*. 2010;222(2):357-364.
- [11] Canalis E, Bilezikian JP, Angeli A, et al. Perspectives on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone*. 2004;34(4):593-598.

- [12] Rubin MR, Bilezikian JP. cal review 151: The role of parathyroid hormone in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis: a re-examination of the evidence. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(9):4033-4041.
- [13] Roth J, Palm C, Scheunemann I, et al. Musculoskeletal abnormalities of the forearm in patients with juvenile idiopathic arthritis relate mainly to bone geometry. *Arthritis Rheum.* 2004;50(4):1277-1285.
- [14] O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI, et al. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology.* 2004;145(4):1835-1841.
- [15] Wang FS, Ko JY, Weng LH, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta attenuates glucocorticoid-induced bone loss. *Life Sci.* 2009;85(19-20):685-692.
- [16] Hill PA, Tumber A. Ceramide-induced cell death/survival in murine osteoblasts. *J Endocrinol.* 2010;206(2):225-233.
- [17] Weinstein RS, Manolagas SC. Apoptosis and osteoporosis. *Am J Med.* 2000;108(2):153-164.
- [18] Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest.* 1998;102(2):274-282.
- [19] Canalis E. Clinical review 83: Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(10):3441-3447.
- [20] Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest.* 1998;102(2):274-282.
- [21] Smith E, Coetzee GA, Frenkel B. Glucocorticoids inhibit cell cycle progression in differentiating osteoblasts via glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem.* 2002;277(20):18191-18197.
- [22] Weinstein RS, Nicholas RW, Manolagas SC. Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(8):2907-2912.
- [23] Calder JD, Pearse MF, Revell PA. The extent of osteocyte death in the proximal femur of patients with osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br.* 2001;83(3):419-422.
- [24] Eberhardt AW, Yeager-Jones A, Blair HC. Regional trabecular bone matrix degeneration and osteocyte death in femora of glucocorticoid-treated rabbits. *Endocrinology.* 2001;142(3):1333-1340.
- [25] Jih-Yang Ko, Feng-Sheng Wang. Increased Dickkopf-1 expression accelerates bone cell apoptosis in femoral head osteonecrosis. *Bone* 46 (2010) 584–591.
- [26] Hampson G, Fogelman I. Clinical role of bisphosphonate therapy. *Int J Womens Health.* 2012;4:455-469.
- [27] Leclerc N, Noh T, Cogan J, et al. Opposing effects of glucocorticoids and Wnt signaling on Krox20 and mineral deposition in osteoblast cultures. *J Cell Biochem.* 2008;103(6):1938-1951.
- [28] Camps M, Nichols A, Arkinstall S. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J.* 2000;14(1):6-16.
- [29] Xu N, Liu H, Qu F, et al. Hypoxia inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts by activation of Notch signaling. *Exp Mol Pathol.* 2013;94(1):33-39.
- [30] Canalis E. Notch signaling in osteoblasts. *Sci Signal.* 2008;1(17):pe17.
- [31] Kitase Y, Barragan L, Qing H, et al. Mechanical induction of PGE2 in osteocytes blocks glucocorticoid-induced apoptosis through both the β -catenin and PKA pathways. *J Bone Miner Res.* 2010;25(12):2657-2668.
- [32] Lombardi G, Di Somma C, Rubino M, et al. The roles of parathyroid hormone in bone remodeling: prospects for novel therapeutics. *J Endocrinol Invest.* 2011;34(7 Suppl):18-22.
- [33] Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell.* 2000;103(2):239-252.
- [34] Heath JK, Atkinson SJ, Meikle MC, et al. Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. *Biochim Biophys Acta.* 1984;802(1):151-154.
- [35] Lin GL, Hankenson KD. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* 2011;112(12):3491-3501.
- [36] Lombardi G, Di Somma C, Rubino M, et al. The roles of parathyroid hormone in bone remodeling: prospects for novel therapeutics. *J Endocrinol Invest.* 2011;34(7 Suppl):18-22.