

镉对小鼠骨生物力学及成骨细胞 MG-63 的影响*

黄泽昊^{1,2} 侯艳丽³ 李君平³ 王立新² 张昌文² 王小岩²
荣海钦³ 任建武¹ 曲广波^{2**}

(1. 北京林业大学, 北京, 100083; 2. 中国科学院生态环境研究中心, 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京, 100085;
3. 山东省内分泌与代谢病研究所, 济南, 250062)

摘要 为了探讨镉对骨的影响及机制, 选取7周龄 C57BL/6J 小鼠给予氯化镉 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射, 每周2次, 染毒4周后进行了骨力学参数的测量. 结果显示, 暴露组股骨的最大弯曲应力及弹性模量降低, 骨灰干重比下降. 体外结果显示, 氯化镉 (CdCl_2) 的暴露影响人成骨肉瘤细胞 MG-63 的细胞形态、活力及增殖, 并且呈剂量依赖性. 因此, 氯化镉暴露可导致小鼠骨量下降和骨力学性能下降, 并对成骨细胞有明显的毒性.

关键词 镉, 骨质疏松, 成骨细胞.

镉是一种人体非必需微量元素, 多与锌、铅、铜以硫化物形式并存. 随着工业的发展, 镉逐渐成为一种普遍存在的重金属元素. 有色金属矿产开发和冶炼排出的废渣、废气和废水以及煤等燃料燃烧排出的烟气, 都会造成不同程度的镉污染^[1-2]. 镉在制造合金和电镀中的使用也会对作业人群产生影响. 对于非吸烟和非职业接触的人群而言, 饮食是镉摄入的重要途径^[3-6]. 联合国粮农组织和世界卫生组织食品添加剂专家委员会 (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive, JECFA) 对镉 (尤其是饮食来源) 的健康效应评价结果表明, 镉对肾和骨的影响是镉毒性的主要方面^[7].

近期的流行病学调查表明, 镉暴露与骨密度下降及骨折发生率升高显著相关^[8-10]. 体内实验表明低浓度镉暴露对骨骼有负面影响^[11]. Brzóska 的研究证实每日只有 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉饮用水的终生暴露也会降低腰椎的机械强度^[12-13]. Miyahara 等发现低水平镉暴露时, 成骨细胞的骨形成能力受到抑制, 并能分泌 PGE2 (前列腺素 E2) 刺激破骨细胞的形成和活化, 增加破骨细胞介导的骨吸收^[14].

目前镉对骨毒性的研究较多, 但具体对骨力学参数、形态学参数影响还不全面. 本文通过探讨镉暴露小鼠骨力学参数的变化及镉对成骨细胞的毒性作用研究了镉对骨代谢的影响.

1 材料与方法

1.1 实验对象

7周龄 C57BL/6J 小鼠8只, 雄性, 清洁级, 体重 $(24.4 \pm 4.6) \text{ g}$, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 在中国科学院遗传与发育研究所饲养. 适应性喂养1周后, 根据体重随机分为两组, 每组4只小鼠. CdCl_2 组腹腔注射 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 CdCl_2 , 每周2次, 共4周, 以腹腔注射磷酸盐缓冲液 (PBS) 作为对照. 采用人成骨肉瘤细胞 MG-63 探讨镉染毒和染毒中止后成骨细胞形态及增殖等生物学功能的改变.

药品与试剂: CdCl_2 购自中天津市光复科技发展有限公司, 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 购自 Amresco 公司, RPMI1640 培养基购自 GIBCO 公司, 胎牛血清及双抗购自 Hyclone 公司.

主要仪器: Sx2-4-10 型箱式电阻炉 (天津中环实验电炉有限公司), AG-1S 日本岛津万能材料实验仪, Zeiss Axiovert 40 CFL 倒置显微镜, Thermo Mutiskan MK3 型酶标仪.

1.2 实验方法

小鼠骨生物力学性能测定: 取左侧股骨, 剔除所附着的肌肉及结缔组织, 用 PBS 纱布包裹于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$

2012年2月21日收稿.

* 国家自然科学基金 (21077128, 20921063, 21177151) 资助.

** 通讯联系人, Tel: 01062849050; E-mail: gbqu@rcees.ac.cn

保存. 测量前从冰箱取出, 放入 PBS 中室温 20 °C 浸泡复湿 3—4 h, 将解冻的股骨置于岛津万能材料实验仪进行三点弯曲实验, 位移测量精度 0.001 mm, 加载速度为 2 mm·min⁻¹, 跨度为 8 mm. 记录载荷-变形曲线, 折断时测量股骨内外径, 从曲线上读取最大载荷、弹性载荷, 并计算弹性载荷和最大弯曲应力.

骨灰干重比测定: 三点弯曲实验折断的股骨, 用生理盐水冲去骨髓, 置于箱式恒温干燥箱 80 °C 烘烤 2 h, 称重为骨干重, 再将股骨置于箱式电阻炉 600 °C 灰化 6 h, 测定骨灰重, 计算灰干重比, 反映骨矿含量.

细胞实验: 人成骨肉瘤细胞 MG-63, 用含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 RPMI1640 培养基在 5% CO₂、37 °C 条件下培养 12 h, 分别以 0.2 mg·L⁻¹、1 mg·L⁻¹、2 mg·L⁻¹、3 mg·L⁻¹、4 mg·L⁻¹ 染毒 24 h 后, 观察细胞形态, 采用 MTT 法及细胞计数法测定细胞增殖能力改变.

1.3 统计学处理

动物实验及细胞实验采用 SPSS 17.0 统计软件处理实验数据, 所有结果以均数 ± 标准差 ($\bar{X} \pm s$) 表示, 组间比较用独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 表示有显著性差异.

2 结果与讨论

2.1 镉对骨代谢的影响

Comelekoglu^[15] 等的研究认为, 低剂量镉接触对正常大鼠骨骼的生物力学指标无影响, 但对骨质疏松大鼠的生物力学指标有显著影响. 此外, Brzoska^[16] 等发现环境水平镉对雄性大鼠骨质影响很小, 仅表现为弱危险因素. 可见目前对镉的骨毒性影响研究结果尚不一致, 可能与所选观测指标不同等因素有关.

骨的力学特征是反映骨质量的重要指标^[17], 力学性能下降常导致骨折发生率升高. 骨的力学指标分为结构力学指标 (如最大载荷及弹性载荷等) 和材料力学指标 (如最大弯曲应力及弹性模量等), 前者受骨几何形状的影响, 后者则取决于骨的构成成分和微结构^[18].

股骨三点弯曲实验是评价骨质量的常用手段, 根据实验过程可以绘制出反映骨结构力学特性的载荷-变形曲线和反映骨材料力学特性的应力-应变曲线. 曲线分为弹性 (Elastic) 和塑性 (Plastic) 两个阶段. 弹性阶段在屈服点 (Yield point) 之前, 为载荷或应力增加到达骨的弹性极限. 在此阶段变形和应变随着载荷或应力的增加而呈线性增加, 如撤销外力作用, 变形的骨组织可恢复到受力前的状态, 反映了骨组织的韧性. 弹性阶段的曲线斜率称为弹性模量 (Elastic Modulus), 这一指标与几何形状无关, 反映骨抵抗变形的能力. 塑性阶段在屈服点之后, 为骨的弹性极限到达骨断裂. 此阶段骨组织已发生结构上的损坏而产生了永久性变形, 其主要原因是骨的微结构产生了器质性变化, 反映了骨组织的延展性或脆性. 最大弯曲应力 (Maximal Bending Stress) 为塑性变形阶段骨样本单位面积上所承受的最大载荷值, 反映抗骨折的能力.

股骨三点弯曲实验的结果表明, 小鼠经 2 mg·kg⁻¹ CdCl₂ 暴露 4 周后, 此剂量的 CdCl₂ 暴露未对股骨的最大载荷及弹性载荷产生显著影响 (图 1).

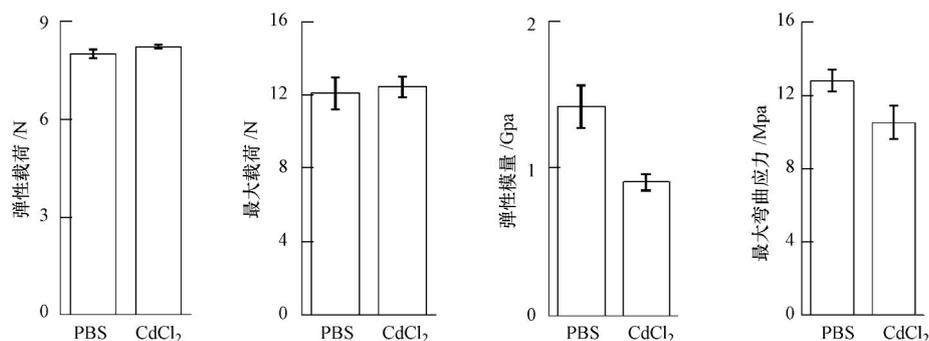


图 1 小鼠股骨力学参数

Fig. 1 The biomechanical parameters of femur in mice

尽管两组间的股骨长度及直径无明显差异(图2),但是除去各自几何形状影响后,暴露组的最大弯曲应力及弹性模量较对照组出现了明显的下降趋势(图1),说明股骨的抗外力变形及抗骨折能力已降低,提示骨的构成成分及微结构出现了损伤。

骨灰重和干重的比值代表骨的矿物质含量,也是评价骨量常用的指标.本实验中,CdCl₂组的骨灰干重比出现了下降的趋势(图3),说明4周的CdCl₂暴露已经引起了骨量减少.成骨细胞活性降低导致骨形成减少和骨矿化不足,相对的破骨细胞活性增加也可导致骨量减少。

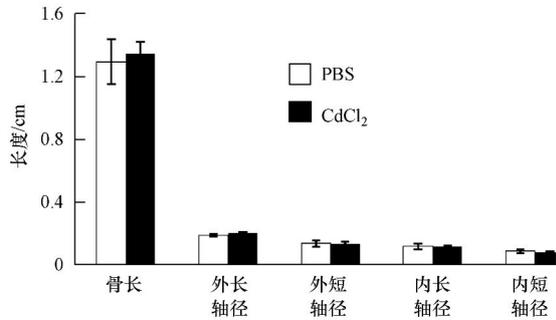


图2 小鼠股骨形态学参数

Fig. 2 The morphological parameters of femur in mice

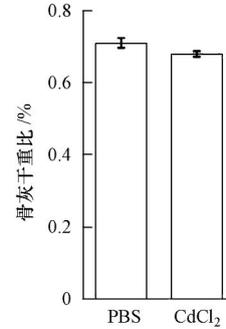


图3 小鼠股骨骨灰干重比

Fig. 3 The ashes-dry weight ratio of femur in mice

2.2 镉影响骨代谢机制的体外实验

镉导致骨毒性的分子机制尽管还未阐释清楚,但已有多篇报道表明镉毒性的产生主要由于镉对骨组织细胞的毒性^[19-20].对人成骨肉瘤细胞MG-63进行不同浓度的镉暴露实验,处理24 h后观察,如图4所示,对照组的细胞形态规整,成梭形生长,细胞界限明显,细胞生长状态良好.以0.2 mg·L⁻¹CdCl₂暴露时,细胞界限开始变得模糊,细胞形状开始改变.1 mg·L⁻¹暴露时,细胞皱缩,边界不整,死亡细胞增加.4 mg·L⁻¹暴露组细胞形态变圆,无存活迹象。

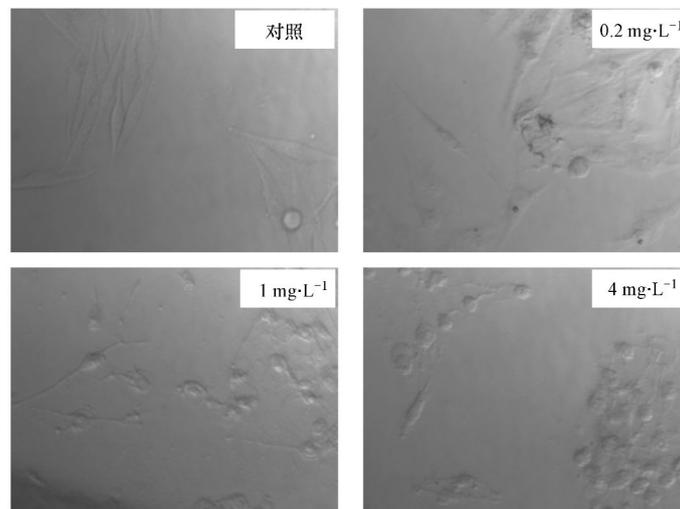


图4 不同浓度镉处理对成骨细胞形态的影响(100×)

Fig. 4 The cell morphology under different concentrations of CdCl₂ exposure (100×)

MTT实验显示,CdCl₂作用24 h后,在0.2 mg·L⁻¹浓度时,对细胞活力已经开始有影响,在4 mg·L⁻¹浓度时,细胞活力显著下降,并呈剂量依赖性(图5)。

细胞在暴露24 h后,在0.2 mg·L⁻¹浓度时的细胞数量为对照组的85%,在4 mg·L⁻¹时仅为对照组的3.2%(图6),CdCl₂对细胞增殖的影响呈现剂量依赖效应. CdCl₂暴露对成骨细胞具有明显的毒性作用,可显著降低细胞增殖能力及活性,从而导致骨形成减少,骨量减少。

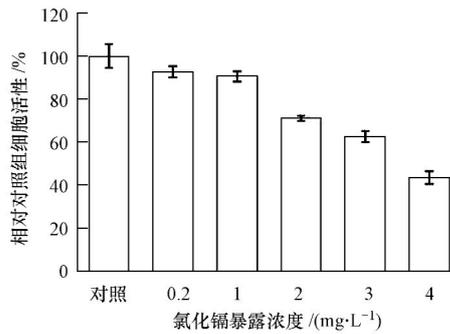


图5 不同浓度镉处理细胞活性

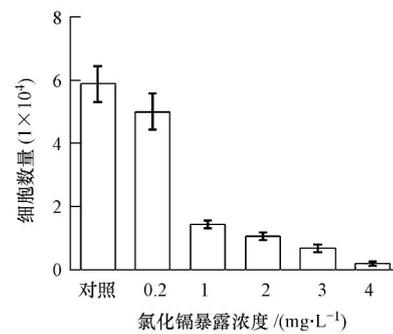
Fig. 5 Cell viability after exposure to various concentrations of CdCl₂

图6 不同浓度镉处理对成骨细胞增殖能力的影响

Fig. 6 Proliferation capacity of MG-63 after exposure to different concentrations of CdCl₂

3 结论

本研究表明,成年小鼠在长期 CdCl₂暴露下骨灰干重比及骨生物力学指标显著降低,说明其骨矿含量及骨质量明显改变;细胞水平的实验证明镉对成骨细胞具有明显的毒性作用,显著影响成骨细胞形态,抑制成骨细胞增殖,这可能是镉引发骨质量下降的主要原因之一. 这对进一步明确镉致骨代谢损伤的过程及分子机制,提出早期发现及有效防治的方法具有重要意义. 此外,镉暴露对人群骨骼健康的影响应得到足够重视.

参 考 文 献

- [1] 王崇臣, 黄忠臣, 王鹏. 北京四环公路两侧植物铅、镉污染现状调查[J]. 环境化学, 2009, 28(4):604-605
- [2] 李敬光, 赵云峰, 吴永宁. 我国持久性有机污染物人体负荷研究进展[J]. 环境化学, 2011, 30(1):5-19
- [3] 成应向, 王强强, 戴友芝, 等. 土著微生物浸出有色冶炼废渣中的镉[J]. 环境化学, 2011, 30(3):703-707
- [4] 肖君, 宫本周亮, 于克锋, 等. 海带对镉、铅的吸附作用及其机理[J]. 环境化学, 2010, 29(2):226-230
- [5] 王小平, 李婷, 李柏. 姬松茸中 Cu, Zn, Ag, Cd 和 Hg 累积特性的初步研究[J]. 环境化学, 2009, 28(1):94-98
- [6] Kazantzis G. Cadmium, osteoporosis and calcium metabolism [J]. Biometals, 2004, 17(5):493-498
- [7] Aitto A, Tritscher A. Effects on health of cadmium-WHO approaches and conclusions [J]. Biometals, 2004, 17(5):491-491
- [8] Akesson A, Bjellerup P, Lundh T, et al. Cadmium-induced effects on bone in a population-based study of women [J]. Environ Health Persp, 2006, 114(6):830-834
- [9] Alfvén T, Elinder C G, Carlsson M D, et al. Low-level cadmium exposure and osteoporosis [J]. Bone Miner Res, 2000, 15(8):1579-1586
- [10] Alfvén T, Järup L, Elinder C G. Cadmium and lead in blood in relation to low bone mineral density and tubular proteinuria. [J]. Environ Health Persp, 2002, 110(7):699-702
- [11] Ando M, Sayato Y, Osawa T. Studies on the disposition of calcium in bones of rats after continuous oral administration of cadmium [J]. Toxicol Appl Pharm, 1978, 46:625-632
- [12] Brzóška M M, Moniuszko-Jakoniuk J. Low-level exposure to cadmium during the lifetime increases the risk of osteoporosis and fractures of the lumbar spine in the elderly: Studies on a rat model of human environmental exposure [J]. Toxicol Sci, 2004, 82(2):468-477
- [13] Brzóška M M, Moniuszko-Jakoniuk J. Low-level lifetime exposure to cadmium decreases skeletal mineralization and enhances bone loss in aged rats [J]. Bone, 2004, 35(5):1180-1191
- [14] Miyahara T, Tonoyama H, Watanabe M, et al. Stimulative effect of cadmium on prostaglandin E2 production in primary mouse osteoblastic cells [J]. Calcified Tissue Int, 2001, 68(3):185-191
- [15] Comelekoglu U, Yalin S, Bagis S, et al. Low-exposure cadmium is more toxic on osteoporotic rat femoral bone: mechanical, biochemical, and histopathological evaluation [J]. Ecotox Environ Safe, 2007, 66(2):267-271
- [16] Brzóška M M, Moniuszko-Jakoniuk J. Bone metabolism of male rats chronically exposed to cadmium [J]. Toxicol Appl Pharm, 2005, 207(3):195-211
- [17] Lill CA, Hessel J, Schlegel U, et al. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis [J]. J Orthop Res, 2003, 21(5):836-842

- [18] 秦岭, 梁国穗. 骨生物力学在防止骨质疏松药物开发中的应用基础(一)[J]. 中国骨质疏松杂志, 2000, 6(1):23-25
- [19] Lévesque M, Martineau C, Jumarie C, et al. Characterization of cadmium uptake and cytotoxicity in human osteoblast-like MG-63 cells [J]. Toxicol Appl Pharm, 2008, 231(8):308-317
- [20] Chen X, Zhu G, Gu S, et al. Effects of cadmium on osteoblasts and osteoclasts in vitro [J]. Environ Toxicol Pharm, 2009, 28(2):232-236

Effects of cadmium on bone biomechanics in mice and osteoblast MG-63

HUANG Zehao^{1,2} *HOU Yanli*³ *LI Junping*³ *WANG Lixin*² *ZHANG Changwen*²
*WANG Xiaoyan*² *RONG Haiqin*³ *REN Jianwu*¹ *QU Guangbo*^{2*}

(1. Beijing Forestry University, Beijing, 100083, China; 2. State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085, China; 3. Shandong Institute of Endocrine and Metabolic Diseases, Jinan, 250062, China)

ABSTRACT

Cadmium is one of the most widely distributed heavy metals in the environment. In this study, C57BL/6 J mice were injected intraperitoneally with cadmium chloride at $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ twice per week. After 4 week exposure, femur was taken out for 3-point-bending test and ashes-dry weight ratio evaluation. The maximal bending stress, elastic modulus and ashes-dry weight ratio of the femur were lower in the exposure group than that in the control one. Cadmium also affected the morphology, activity and proliferation of osteoblast-like cells MG-63 in a dose-dependent manner. Our results suggest that cadmium exposure induces the decrease in bone mass and biomechanics in mice, and obvious toxicity to osteoblasts.

Keywords: cadmium, osteoporosis, osteoblast.