

骨髓间充质干细胞来源成骨细胞培养体系中加入 α -玉米赤霉醇干预后的骨保护素表达***

刘未华¹, 段斐¹, 李少春¹, 孙晓芳¹, 郝华超¹, 何静¹, 薛娟¹, 邓鑫¹, 罗雷雷¹, 郭文龙²

Effects of α -zeranol on expression of osteoprotegerin in bone marrow mesenchymal stem cells-derived osteoblasts

Liu Wei-hua¹, Duan Fei¹, Li Shao-chun¹, Sun Xiao-fang¹, Hao Hua-chao¹, He Jing¹, Xue Juan¹, Deng Xin¹, Luo Lei-lei¹, Guo Wen-long²

Abstract

BACKGROUND: Studies showed that α -zeranol (α -ZAL) has significant prevention and treatment effect on postmenopausal osteoporosis.

OBJECTIVE: To observe the effects of α -ZAL on the secretion of osteoprotegerin (OPG) and expression of OPG mRNA in osteoblasts of the rats.

METHODS: Estrogen and α -ZAL (10^{-5} – 10^{-10} mol/L) were added into *in vitro* cultured osteoblasts respectively for intervention.

RESULTS AND CONCLUSION: The results of ELISA and RT-PCR showed that after application of different concentrations of α -ZAL (10^{-5} – 10^{-10} mol/L), the secretion of OPG and expression of OPG mRNA in the estrogen group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). The results confirmed that in the bone marrow mesenchymal stem cells-derived osteoblast, adding α -ZAL can promote osteoblast OPG secretion and mRNA expression.

¹School of Basic Medical Science, Hebei University, Baoding 071000, Hebei Province, China; ²Department of Emergency, Laishui Hospital, Laishui 074100, Hebei Province, China

Liu WH, Duan F, Li SC, Sun XF, Hao HC, He J, Xue J, Deng X, Luo LL, Guo WL. Effects of α -zeranol on expression of osteoprotegerin in bone marrow mesenchymal stem cells-derived osteoblasts. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(6):977-980. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

Liu Wei-hua, Teaching assistant, School of Basic Medical Science, Hebei University, Baoding 071000, Hebei Province, China
doctorliu09@163.com

摘要

背景: 研究显示 α -玉米赤霉醇对绝经后骨质疏松症具有明显的防治作用。

目的: 观察 α -玉米赤霉醇对体外大鼠成骨细胞骨保护素分泌及其 mRNA 表达的影响。

方法: 将体外培养的成骨细胞中分别加入雌激素和 α -玉米赤霉醇(10^{-5} ~ 10^{-10} mol/L)进行干预。

结果与结论: ELISA 法和 RT-PCR 检测发现, 不同浓度的 α -玉米赤霉醇(10^{-5} ~ 10^{-10} mol/L)作用于成骨细胞后, 骨保护素的分泌量及细胞骨保护素 mRNA 表达较对照组均增加($P < 0.05$)。结果证实, 在骨髓基质细胞来源的成骨细胞中加入 α -玉米赤霉醇可促进成骨细胞骨保护素的分泌及其 mRNA 的表达。

关键词: 成骨细胞; 破骨细胞; 骨保护素; α -玉米赤霉醇; 绝经后骨质疏松症; 干细胞因子

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.06.006

Correspondence to: Duan Fei, Doctor, Professor, Doctoral supervisor, School of Basic Medical Science, Hebei University, Baoding 071000, Hebei Province, China
feiduan9999@sina.com

刘未华, 段斐, 李少春, 孙晓芳, 郝华超, 何静, 薛娟, 邓鑫, 罗雷雷, 郭文龙. 骨髓间充质干细胞来源成骨细胞培养体系中加入 α -玉米赤霉醇干预后的骨保护素表达[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(6):977-980. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

Supported by: Population and Family Planning Commission Project of Hebei Province, No. 2010-A03*; Pre-research Fund Project of Hebei University School of Basic Medical Science, No.2007JY04*; Special Fund for Subject Construction Project of Hebei University School of Basic Medical Science No.2012A2002*

Received: 2011-12-01
Accepted: 2012-01-04

0 引言

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP)是指绝经后妇女发生的以低骨量及骨组织微结构退行性病变为特征的一种全身性骨代谢疾病^[1-2]。PMOP的发生主要是由于卵巢功能衰退、雌激素水平下降,从而导致骨吸收量大于骨形成量,出现低骨量和骨组织微结构退行性病变。

雌激素替代疗法 (hormone replacement therapy, HRT)以前一直被认为是治疗PMOP的首选治疗方法,然而,长期应用雌激素后可以带来严重的不良反应,如诱发乳腺癌、子宫内膜癌及静脉血栓等。 α -玉米赤霉醇 (α -zeranol, α -ZAL)是一种新型植物雌激素,

具有雌激素样作用,而对子宫与乳腺的刺激明显小于雌激素,是具有广阔应用前景的雌激素替代药物。已有研究发现, α -玉米赤霉醇具有与雌激素类似的心血管保护作用,能够产生改善血脂代谢、抑制血小板黏附和聚集、保护血管内皮等作用^[3],但对其防治绝经后骨质疏松症的研究较少报道。

本课题组在前期实验中采用大鼠卵巢切除法建立骨质疏松症模型,应用 α -玉米赤霉醇替代雌激素作用于去卵巢大鼠,结果显示 α -玉米赤霉醇对PMOP具有明显的防治作用^[4-5]。为进一步探讨 α -玉米赤霉醇抗骨质疏松症的机制,实验采用体外培养成骨细胞,利用不同浓度的 α -玉米赤霉醇干预成骨细胞,观察 α -玉米赤霉醇对成骨细胞内骨保护素分泌及其mRNA表达变化的影响。

¹ 河北大学基础医学院, 河北省保定市 071000; ² 涿水县医院急诊科, 河北省涿水县 074100

刘未华, 男, 1979年生, 河北省保定市人, 汉族, 2004年河北医科大学毕业, 助教, 主要从事人体解剖学方面的研究。
doctorliu09@163.com

通讯作者: 段斐, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 河北大学基础医学院, 河北省保定市 071000
feidian9999@sina.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2012)06-00977-04

收稿日期: 2011-12-01
修回日期: 2012-01-04
(20111114005/WJ-G)

1 材料和方法

设计: 细胞学, 体上对比观察实验。

时间及地点: 于2010-09/2011-07在河北大学生命科学学院实验室完成。

材料:

实验动物: 健康清洁级新生SD大鼠20只, 购自北京维通利华公司, 动物许可证号: SCXK(京)2010-0009。实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》^[6]。

主要试剂:

试剂	来源
α -玉米赤霉醇, 雌激素, II型胶原酶	sigma 公司
DMEM 培养基	Gibco 公司
胎牛血清	四季青公司
胰蛋白酶	Ameresco 公司
骨保护素 ELISA 检测试剂盒	BlueGene 公司
Trizol 试剂, RNA 反转录试剂盒	Invitrogen 公司

方法:

大鼠成骨细胞的分离与培养: 将新生的SD大鼠20只, 断颈椎处死后放入体积分数75%乙醇中浸泡消毒10 min; 将头部取下放在加有双抗的PBS中, 无菌操作取出颅盖骨。将颅骨置于不含双抗的PBS中, 用手术刀片清除骨膜、血管和结缔组织, 并用PBS液洗涤3次。将颅骨放在小瓶中用眼科剪剪碎, 加0.25%胰酶消化15 min, 用PBS洗涤、离心。然后将颅盖骨浸入体积分数0.1% II型胶原酶消化液中, 37 °C振荡消化60 min, 以消化清除骨髓和纤维组织。离心将细胞团块移入另一含体积分数0.1% II型胶原酶的消化液小瓶中, 37 °C振荡消化60 min。加完全培养基中止消化, 用吸管吹打数次, 过150目的细胞筛网, 在1 300 r/min下离心10 min, 倾弃上清液, 沉淀的细胞团加入含15%胎牛血清的DMEM培养基, 吹打使细胞悬浮, 以 9×10^3 接种到培养瓶中。

待细胞长满瓶底的80%, 用0.25%胰蛋白酶消化细胞, 1 000 r/min下离心10 min。采用差速贴壁法, 将先行贴壁的成纤维细胞去掉, 将上清液转移到另一培养瓶中, 重复2次, 于37 °C, 体积分数5%CO₂培养箱内进行培养。每隔两三天换液1次。

分组及干预: 根据文献^[7]报道, 取第3代大鼠成骨细胞以每孔 9×10^4 个细胞的数量接种于6孔板, α -玉米赤霉醇稀释成6个浓度: 10^{-5} , 10^{-6} ,

10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} mol/L, 同时设细胞对照组和雌激素对照组。分别在24, 48, 72 h时, 收集上清液。上清液中骨保护素水平检测按骨保护素 ELISA试剂盒说明书进行操作, 检测大鼠成骨细胞分泌的骨保护素浓度。

RT-PCR检测各组骨保护素的mRNA的表达: Trizol法提取成骨细胞的总RNA, 以RT-PCR技术检测各组细胞骨保护素 mRNA的表达。根据Genebank用引物设计软件Primer Premier设计骨保护素和GAPDH两对基因的引物, 委托上海生工生物工程公司合成。

引物系列:

基因	PCR 引物序列(5'-3')	扩增片段长度 (bp)
OPG	上游: TCCTGGCACCTACCTAA AACAGCA	578
	下游: CTACACTCTCTCTGCAT TCACTTTGG	
GAPDH	上游: TGAACGGGAAGCTCA CTGG	307
	下游: TCCACCACCCTGTTGC TGTA	

扩增最后取PCR扩增产物点样于1.5%琼脂糖凝胶, 75 V电压电泳, 电泳后分析各基因条带的吸光度值, 计算骨保护素与GAPDH的吸光度比值(相对吸光度)。

主要观察指标: 各组骨保护素浓度及mRNA的表达。

统计学分析: 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 17.0统计学软件进行数据分析, 组间数据差异比较采用单因素方差分析, 组间均数差异的两两比较采用SNK-q法检测, $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验大鼠20只均进入结果分析, 无脱落。

2.2 大鼠成骨细胞骨保护素浓度的变化 检测细胞上清液中骨保护素分泌量结果显示, 干预培养24~72 h后, α -玉米赤霉醇各浓度组和雌激素组细胞上清液中骨保护素的分泌量较对照组明显升高($P < 0.05$); α -玉米赤霉醇各浓度组之间以及 α -玉米赤霉醇各浓度组与雌激素组之间上清液中骨保护素表达量差异无显著性意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 α -玉米赤霉醇和雌激素对成骨细胞分泌骨保护素的影响
Table 1 Effect of α -zearanol (α -ZAL) and estrogen on the secretion of osteoprotegerin in osteoblasts ($x \pm s$, ng/L)

Group	Time of culture (h)		
	24	48	72
α -ZAL 10^{-5} mol/L	0.472 \pm 0.187 ^a	0.627 \pm 0.218 ^a	0.931 \pm 0.038 ^a
α -ZAL 10^{-6} mol/L	0.632 \pm 0.248 ^a	0.851 \pm 0.239 ^a	1.484 \pm 0.052 ^a
α -ZAL 10^{-7} mol/L	0.423 \pm 0.141 ^a	0.562 \pm 0.170 ^a	1.030 \pm 0.091 ^a
α -ZAL 10^{-8} mol/L	0.447 \pm 0.326 ^a	0.587 \pm 0.160 ^a	1.075 \pm 0.043 ^a
α -ZAL 10^{-9} mol/L	0.497 \pm 0.060 ^a	0.637 \pm 0.158 ^a	1.130 \pm 0.045 ^a
α -ZAL 10^{-10} mol/L	0.408 \pm 0.120 ^a	0.617 \pm 0.088 ^a	1.030 \pm 0.038 ^a
Control	0.102 \pm 0.019	0.208 \pm 0.018	0.392 \pm 0.059
Estrogen	0.731 \pm 0.279 ^a	0.771 \pm 0.156 ^a	1.075 \pm 0.048 ^a

^a $P < 0.05$, vs. control group

2.3 各组骨保护素 mRNA 的表达 见表2, 图1。

表2 α -玉米赤霉醇和雌激素对成骨细胞骨保护素 mRNA 表达的影响
Table 2 Effect of α -zearanol (α -ZAL) and E2 on the expression of osteoprotegerin mRNA in osteoblast cells ($x \pm s$, ng/L)

Group	Time of culture (h)		
	24	48	72
α -ZAL 10^{-5} mol/L	0.425 \pm 0.065 ^a	0.736 \pm 0.055 ^a	0.816 \pm 0.030 ^a
α -ZAL 10^{-6} mol/L	0.819 \pm 0.079 ^a	0.890 \pm 0.015 ^a	0.892 \pm 0.038 ^a
α -ZAL 10^{-7} mol/L	0.655 \pm 0.076 ^a	0.534 \pm 0.031 ^a	0.712 \pm 0.026 ^a
α -ZAL 10^{-8} mol/L	0.690 \pm 0.036 ^a	0.682 \pm 0.119 ^a	0.780 \pm 0.032 ^a
α -ZAL 10^{-9} mol/L	0.487 \pm 0.057 ^a	0.660 \pm 0.089 ^a	0.740 \pm 0.082 ^a
α -ZAL 10^{-10} mol/L	0.643 \pm 0.026 ^a	0.622 \pm 0.112 ^a	0.675 \pm 0.088 ^a
Control	0.283 \pm 0.023	0.529 \pm 0.084	0.551 \pm 0.067
E2	0.650 \pm 0.038 ^a	0.764 \pm 0.059 ^a	0.800 \pm 0.075 ^a

^a $P < 0.05$, vs. control group

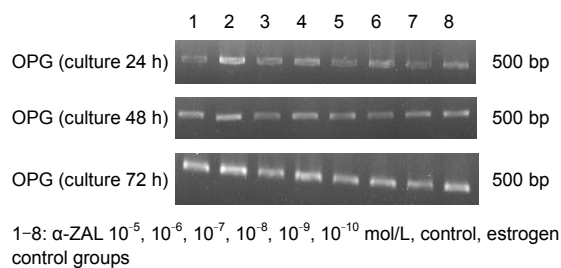


Figure 1 Intervention of α -zearanol (α -ZAL) and estrogen on the expression of osteoprotegerin (OPG) mRNA in osteoblasts of the rats

图1 α -玉米赤霉醇和雌激素干预大鼠成骨细胞骨保护素 mRNA 的表达

不同浓度的 α -玉米赤霉醇和雌激素作用于大鼠成骨细胞24~72 h后, 各组成骨细胞的骨保护素 mRNA 表达量与对照组相比均显著增加($P < 0.05$), 雌激素组和 α -玉米赤霉醇各浓度组骨保护素mRNA表达量差异无显著性意义($P > 0.05$)。

3 讨论

实验利用体外培养大鼠成骨细胞, 检测了不同浓度

α -玉米赤霉醇对成骨细胞分泌的骨保护素和细胞内mRNA表达的影响, 结果显示, α -玉米赤霉醇能促进成骨细胞内骨保护素分泌, 并上调细胞内骨保护素mRNA的表达水平。这一结果可能与 α -玉米赤霉醇产生的骨保护作用有关。

骨保护素在对抗骨质疏松发生过程中具有重要意义。骨质疏松症是由于骨代谢过程中破骨细胞的骨吸收过程超过成骨细胞的骨形成过程导致的, 近年来的许多研究均发现骨保护素在调节骨代谢过程中发挥着重要作用, 许多激素和细胞因子都可以通过调节骨保护素而对破骨细胞的生成产生作用。骨保护素是在1997年Simonet等^[8]首先发现的一种分泌性糖蛋白, 由成骨细胞分泌, 可抑制破骨细胞的分化成熟。Lacey等^[9]用骨保护素作探针, 找到位于成骨细胞膜表面骨保护素的配体RANKL, 确认它就是既往认为的破骨细胞分化因子, 可促进破骨细胞的分化成熟。

骨保护素/RANKL/RANK是调节破骨细胞分化和功能的重要系统, 对破骨细胞的分化、成熟及凋亡过程产生重要的调节作用^[10]。RANKL或称为破骨细胞分化因子, 是由成骨细胞及骨髓基质细胞产生的, 存在于成骨细胞膜上。RANKL可以诱导多能破骨细胞祖细胞分化成熟。同时研究还发现^[11-13], RANKL对成熟的破骨细胞也能刺激其活性。RANK是位于破骨细胞前体细胞或破骨细胞细胞膜上的RANKL受体, 也是RANKL发挥促破骨细胞作用的唯一靶信号受体, RANKL与RANK结合后可促进破骨细胞分化成熟, 并抑制其凋亡。骨保护素是由成骨细胞及骨髓基质细胞分泌产生的RANKL的假性受体, 可以竞争性与RANKL结合, 阻止RANKL与RANK之间的结合, 从而抑制RANKL的促破骨细胞分化成熟作用, 发挥其抗骨吸收作用。骨保护素表达缺陷的小鼠则表现严重的骨质疏松及高的骨折发生率^[14], 用骨保护素治疗溶骨性疾病也发现, 骨保护素能够抑制破骨细胞形成, 增加骨密度^[15-16]。这些研究结果表明, 骨保护素调控破骨细胞形成及活化的功能可能为骨代谢疾病的临床治疗和预防提供有效方法。

已有的研究发现, 一些对骨质疏松症产生保护作用的干预措施均可通过调节骨保护素的表达而产生作用。许多激素和细胞因子在破骨细胞表面缺乏相应的受体, 它们最终可以通过影响成骨细胞分泌的骨保护素和RANKL的表达来调控破骨细胞的分化和功能, 这种途径就是对破骨细胞调节的间接途径。本次实验利用体外培养大鼠成骨细胞, 观察不同浓度的 α -玉米赤霉醇对成骨细胞分泌的骨保护素和细胞内骨保护素mRNA表达的影响。结果显示, 不同浓度的 α -玉米赤霉醇(10^{-5} ~ 10^{-10} mol/L)作用于成骨细胞后, 骨保护素的分泌量均有不同程度的增加, 且随着 α -玉米赤霉醇浓度的增加骨保护素的分泌量也相应增加; 同时还发现随着

时间的延续, 骨保护素的分泌量也相应增加。这在一定程度上解释了 α -玉米赤霉醇产生骨保护作用的机制, 调节骨保护素的表达可能是其对抗骨丢失的原因之一。

综上所述, α -玉米赤霉醇可刺激成骨细胞释放骨保护素, 从而降低破骨细胞的活力, 抑制破骨细胞的分化与成熟, 导致成骨细胞性骨形成能力增强和破骨细胞性骨吸收能力的下降, 对骨质疏松起到防治作用。此外, 在体外实验中也发现, 成骨细胞中骨保护素的表达可被雌激素受体拮抗剂所阻断, 这就提示雌激素是通过其受体途径对骨保护素的表达产生的调节作用。而许多研究也证实, α -玉米赤霉醇能对雌激素受体产生激动作用从而产生雌激素样效应。因此, 实验推测 α -玉米赤霉醇也能对成骨细胞的雌激素受体产生激动作用, 从而调节成骨细胞骨保护素的表达, 这些在后期的实验中将进一步的探讨; 同时实验未对RANKL进行相关的检测, 也有待于进一步研究。

[8] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89(2):309-319.

[9] Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(3):165-176.

[10] Preisinger E. RANK/RANK-Ligand/OPG: Ein neuer Therapieansatz in der Osteoporosebehandlung. *Journal für Mineralstoffwechsel*. 2011;14(4):144-145.

[11] Burgess TL, Qian YX, Kanfman S, et al. The ligand for osteogerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol*. 1999; 145: 527-538.

[12] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998;12(9):1260-1268.

[13] Croucher PJ, Shipman CM, Lippitt J. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood*. 2001;98(13):3534-3540.

[14] Yang L, Hai Y, Zhou JL. Osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand expression during human marrow stromal cell differentiation and their effect on osteoclast formation. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(13):2033-2037.

[15] Liu YY, Long L, Wang SY, et al. Circulating Dickkopf-1 and osteoprotegerin in patients with early and longstanding rheumatoid arthritis. *Chin Med J (Engl)*. 2010;123(11):1407-1412.

[16] Fan R, Sun B, Zhang CF, et al. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin expression in chronic apical periodontitis: possible association with inflammatory cells. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124(14):2162-2166.

4 参考文献

[1] Yao Y, Hu LN. *Shiyong Fuchanke Zazhi*. 2006;22(7):385. 姚远, 胡丽娜. 绝经后骨质疏松概述[J]. *实用妇产科杂志*, 2006, 22(7): 385.

[2] Sun Y, Yang Y. *Shiyong Fuchanke Zazhi*. 2006;22(7):440. 孙阳, 杨茵. 绝经后骨质疏松症药物防治的循证评价[J]. *实用妇产科杂志*, 2006, 22(7):440.

[3] Chen L, Wang W, Jiang DQ. *Zhongguo Shiyong Yiyao*. 2007; 2(31):1-2. 陈鹭, 王雯, 蒋东桥. 植物雌激素 α -玉米赤霉醇的心血管保护作用[J]. *中国实用医药*, 2007, 2(31):1-2.

[4] Li SC, Duan F, Chen W, et al. *Shizhen Guoyi Guoyao*. 2011; 22(7): 1655-1656. 李少春, 段斐, 程炜, 等. 植物雌激素 α -玉米赤霉醇对去卵巢大鼠骨组织形态学变化的影响[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(7):1655-1656.

[5] Li SC, Chen W, Duan F. *Yiyue Yanjiu Yu Jiaoyu*. 2010;27(3):6-8. 李少春, 程炜, 段斐. α -玉米赤霉醇对去卵巢大鼠骨生物力学的影响[J]. *医学研究与教育*, 2010, 27(3):6-8.

[6] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. *Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals*. 2006-09-30.

[7] Gao W, Duan F, Li SC. *Jiankang Bidu*. 2011(3):2-3. 高文, 段斐, 李少春. α -玉米赤霉醇对体外培养成骨细胞增殖的影响[J]. *健康必读(下旬刊)*, 2011, (3):2-3.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 河北省人口与计划生育委员会项目 (2010-A03); 河北大学医学部预研资助项目 (2007JY04); 河北大学医学部学科专项资金建设项目 (2012A2002)。

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。

伦理批准: 实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

文章概要: 实验主要探讨 α -玉米赤霉醇对骨保护素/RANK/RANKL 系统的影响及其作用的具体的信号传导途径, 证明了 α -玉米赤霉醇可以刺激成骨细胞分泌骨保护素并上调其 mRNA 的表达。

外国专家修饰的医学英语句型: “FK506 在组织工程化人工神经中应用的可能性”

中文	英文修后	英文修前
以探讨 FK506 在组织工程化人工神经中应用的可能性	In addition, the suitability of FK506 application as tissue engineered artificial nerves was considered.	to explore the possibility of FK506 application to tissue engineered artificial nerves.
无相关试验证实	Little is known about	It remains poorly understood