

c-Fos、c-Jun 在兔成骨样细胞内的表达

王卫华 于世凤 高岩 庞淑珍 王晶

摘要 用组织块移植法对兔颅骨细胞进行分离培养。相差显微镜观察,组织化学染色,免疫组织化学染色,mRNA 原位杂交及体外钙化检测表明该细胞群符合成骨样细胞的特点。在此基础上用免疫组织化学 SP 法观察了 c-Fos,c-Jun 在成骨样细胞内的表达及其与骨钙素合成的关系。结果显示 c-Fos,c-Jun 从第一代到第十一代成骨样细胞内均有表达,且早期表达较多,可位于胞核、核膜及胞浆内。第六代以后的细胞仅胞浆着色。在 c-Fos,c-Jun 高表达时骨钙素合成减少,c-Fos,c-Jun 低表达时骨钙素合成增加,提示 c-Fos,c-Jun 对骨钙素具有负调控作用。本实验结果为 c-Fos,c-Jun 参与骨代谢提供了直接证据,同时也为观测成骨细胞生长分化及其影响因素提供了有价值的指标,有助于促进牙周炎牙槽骨吸收机理及其它骨代谢相关研究。

关键词 c-Fos c-Jun 成骨细胞

c-Fos and c-Jun expression in rabbit osteoblast-like cells

Wang Weihua, Yu Shufeng, Gao Yan,

Pang Shuzhen and Wang Jing

Department of Oral Pathology, School of Stomatology,

Beijing Medical University, Beijing 100081, China

Abstract Osteoblast-like cells from rabbit calva have been successfully isolated by tissue explant culture. In these cells, c-fos and c-jun gene expression in the protein level and their relationships with osteocalcin gene expression have been observed. The results showed that c-Fos and c-Jun were expressed in the different passages from the first to the eleventh, and the expression level was higher in the first passage than in the later since sixth. The stain could be found in nuclei, nuclear membrane and cytoplasm in the earlier passages. In the later passages only cytoplasm was stained in brown color. When the c-Fos and c-Jun were expressed in the higher level, the synthesis of osteocalcin decreased. These results provide direct evidence for the participation of the c-Fos and c-Jun in bone metabolism and provide valuable indices for observing the growth and differentiation of osteoblast cells. The c-Fos and c-Jun play a great role in the study of bone metabolism, such as the regulation of osteoclastic bone resorption and the mechanism of alveolar bone resorption in periodontitis.

Key words c-Fos c-Jun Osteoblast

c-Fos,c-Jun 分别由原癌基因 c-fos,c-jun 编码,为核磷酸化蛋白,与 DNA 转录因子 AP-1(activator protein 1)结合,参与细胞生长分化调控机制。许多骨代谢相关基因如骨钙素、I 型胶原、基质金属蛋白胶原酶、基质溶解素、碱性磷酸酶等基因的启动子区均有 AP-1 结构。推

断 c-Fos,c-Jun 与骨代谢有关^[1-4]。本文采用体外实验方法,观察 c-Fos,c-Jun 在兔颅骨分离培养之成骨样细胞的表达及其与骨钙素表达的关系,为进一步揭示 c-Fos,c-Jun 在骨代谢中的作用奠定基础,同时也为研究成骨细胞及其相关因素在骨代谢中的作用提供有价值的分析

指标。

1 材料与方法

1.1 成骨细胞的分离及原代培养

取出生 24 小时内日本大耳白兔 4 只, 无菌下取颅骨, 剥离软组织与骨膜。用 D-hanks 液洗净后, 将其剪成 $0.3 \sim 0.5 \text{cm}^2$ 大小的骨组织块。用 0.25% 胰蛋白酶消化两次, 弃上清。将骨块分散移于 60mm 的培养皿内, 37°C 放置 1.5 ~ 2 小时, 而后缓慢加入 199 培养液 (内含胎牛血清 10%, 青、链霉素各 100U/ml) 3ml。置 CO_2 孵箱, 37°C , 饱和湿度下培养。

1.2 成骨细胞的鉴定^[5-7]

培养细胞长满平皿后移去骨片, 用 0.25% 胰酶消化, 制成细胞悬液, 作传代培养。隔两天换新培养液, 于细胞指数生长期将细胞种于消毒好的盖玻片上。培养 48 小时后取出盖玻片, 分别行常规 HE 染色, α -萘酚磷酸脂法碱性磷酸酶染色, 甲苯胺蓝染色, 爱尔新蓝染色, 骨钙素免疫组化染色, I、II 型胶原地高辛标记 mRNA 原位杂交。为了检测成骨细胞的体外钙化能力, 从接种当天开始采用特异性培养液进行培养即 199 完全培养液, Vitc $50 \mu\text{g}/\text{ml}$, β -甘油磷酸钠 1mmol , CaCl_2 $100 \text{mg}/\text{L}$ 。隔天更换一次培养液。培养 28 天后取出盖玻片, 95% 乙醇固定, 用 Alizarin red S 方法进行钙染色。

1.3 c-Fos, c-Jun 及骨钙素的免疫组化染色

分别将第一代、第四代、第六代、第八代、第十一代成骨样细胞于指数生长期, 用 0.25% 胰酶消化接种于四分之一大小盖玻片上。每代细胞接种盖玻片 3 张。48 小时后取出盖玻片, 用 4% 中性缓冲福尔马林固定 15 分钟。用 SP 法行免疫组化染色。具体步骤如下: (1) 甲醛固定后用 PBS 冲洗 5 分钟 $\times 3$ 。(2) 0.5% Triton X-100, RT, 20 分钟。(3) BPS 洗 5 分钟 $\times 2$ 。(4) 0.3% H₂O₂ 30 分钟。(5) BPS 洗 5 分钟 $\times 2$ 。(6) 正常血清封闭 10 分钟。(7) 吸去血清滴加 1 抗。各种抗体的稀释度分别是 c-Fos 1:20, c-Jun 1:10, 骨钙素 1:100, 4°C 过夜。(8) 滴加 2 抗 universal biotinylated second antibody 1:200 稀释, 20 分钟。(9) BPS 洗 5 分钟 $\times 2$ 。(10) 滴加 Strep-

tavidin/peroxidase conjugate, 1:200 稀释, 20 分钟。(11) BPS 洗 5 分钟 $\times 2$ 。(12) DAB 显色 5 分钟。棕黄色颗粒为阳性着色, 同时用 PBS 代替 1 抗作阴性对照。

1 抗 c-Fos, c-Jun 蛋白抗体为多克隆, Sant Cruz 产品。骨钙素抗体亦为多克隆, 购自福瑞公司。

2 结果

2.1 分离培养成骨样细胞的相差显微镜观察

新生兔颅骨骨片贴壁培养 7~10 天, 见有细胞从骨片移出。排列紧密, 大多呈梭形。传代后细胞形态多样, 可以是多边形、三角形、鳞片形、短梭形及海星状等。排列方式可以是分散交织状, 亦可似上皮样集落生长。加入 VitC, β -甘油磷酸钠, 细胞即呈复层生长, 相互交织。未见拉网现象。

2.2 分离成骨样细胞的组织染色及钙化染色

HE 染色: 光镜下成骨样细胞呈类圆形, 多角形, 三角形, 长突起形等多种形态。胞核嗜碱性, 单个, 位于中央或一端, 圆形或卵圆形。

阿尔辛蓝染色: 胞浆呈阳性着色。

甲苯胺蓝染色: 细胞异染, 胞浆呈紫色, 胞核红染。

碱性磷酸酶染色: 部分细胞胞浆内出现黑色颗粒, 见图 1。

骨钙素免疫组化染色: 95% 以上细胞胞浆着黄褐色, 均匀分布, 为阳性反应。PBS 代替 1 抗对照片染色阴性。

I、II 型胶原地高辛标记 mRNA 原位杂交: 95% 成骨样细胞 I 型胶原 mRNA 高强度表达, 细胞胞浆内布满紫蓝色颗粒, 而所有细胞 II 型胶原 mRNA 阴性着色 (见图 2)。

钙茜素红染色: 细胞经前述特殊培养液连续培养 28 天后行 Alizarin red S 染色。细胞外可见橙红色颗粒出现, 呈结节状, 大小不等。有些染色均匀, 有些染色呈细小颗粒状, 有些呈同心圆结构 (见图 3)。

2.3 c-Fos, c-Jun 在成骨样细胞内的表达

从第一代到第十一代成骨样细胞内均有 c-Fos, c-Jun 蛋白表达, 且二者表达同步。早期培

养细胞第一代到第四代,胞核、核膜、胞浆内均可着色,且染色较深。第六代以后成骨样细胞仅胞浆着色,且染色较第一代成骨样细胞明显减弱(见图4、图5)。

2.4 c-Fos, c-Jun 与骨钙素表达的关系

第一代与第四代成骨样细胞 c-Fos, c-Jun 染色较深而骨钙素免疫组化着色较浅。培养第六代以后成骨样细胞 c-Fos, c-Jun 染色较浅,但骨钙素着色较深。二者呈负相关(见图6、图7)。

3 讨论

成骨细胞不但分泌骨基质参与成骨,同时也参与破骨细胞骨吸收功能的调节,是骨代谢的主要功能细胞。目前体外分离成骨细胞原代培养方法已基本建立,为体外研究骨代谢提供了有效手段。我们采用组织块移植法分离培养了新生兔颅骨细胞。相差显微镜下观察,细胞胞体较大,细胞形态多样,可以是多边形、三角形、鳞片形、短梭形及海星状不等,既可分散分布,亦可呈集落样生长;碱性磷酸酶染色部分细胞阳性;甲苯胺蓝异染,爱尔新蓝弱阳性染色;95%细胞 I 型胶原 mRNA 高表达,所有细胞 II 型胶原 mRNA 原位杂交结果为阴性;非胶原蛋白骨钙素呈阳性表达;加入 VitC, β -甘油磷酸钠,细胞即呈复层生长,相互交织并可出现体外钙化。该细胞群符合成骨细胞的特点,称其为成骨样细胞。

成骨细胞在体外具有分裂增殖能力,并且经历如下三个阶段:①生长增殖期;②细胞外基质成熟期;③细胞外基质钙化期。在不同的分化期有不同的骨代谢相关基因表达^[9]。

c-Fos, c-Jun 为快速早期基因,在刺激因子作用下,具有在转录水平快速激活的特点,分别编码相应的核磷酸化蛋白 c-Fos, c-Jun。其功能的重要性体现在不同种属间具有高度的保守性。如小鼠与人类 c-Fos 氨基酸序列有 94% 的同源性。这两种原癌基因蛋白的主要功能区由 88 个氨基酸组成,每隔 7 个氨基酸就有亮氨酸残基的出现,称其为 Leucine Zipper,该区为与 DNA 结合的基本区域。c-Fos 可与 c-Jun 结合

形成异二聚体,而 c-Jun 只能与其自身形成二聚体。c-Fos 与 c-Jun 结合形成的异二聚体与 DNA 的亲合力远远大于单纯 c-Jun 二聚体与 DNA 的亲合力。c-Fos, c-Jun 复合物与 DNA 转录因子 AP-1 结合,参与细胞生长分化的转录调控机制^[9]。目前认为 c-Fos, c-Jun 调节成骨细胞的生长、分化主要基于下述实验:①c-fos 为 FBJ 小鼠成骨肉瘤病毒的主要转化成份^[10]。②c-fos 转基因小鼠骨与软组织成瘤,而其它组织无可见效应^[11]。③成骨细胞生长分化旺盛区域如胚胎骨生长区及中胚层网状组织内有 c-Fos 表达^[12]。④c-fos 基因无效突变后可致骨组织硬化^[13]。⑤体外培养下 VitD₃, PTH、胰岛素样生长因子能引起成骨样细胞 c-Fos 的快速表达^[14,15]。但对成骨细胞生理状态下 c-Fos 的表达规律并未作系统探讨。我们用体外培养的方法观察了 c-Fos, c-Jun 在兔成骨样细胞内的表达情况及其与骨钙素表达的相关性。发现 c-Fos, c-Jun 在从第一代到第十一代不同分化时期的成骨样细胞内均有表达,且在培养早期表达较多,可位于胞核、核膜、胞浆内,而在培养较晚期仅在胞浆内表达。在 c-Fos, c-Jun 高表达时,骨钙素合成减少。说明 c-Fos, c-Jun 表达对成骨样细胞合成非胶原基质骨钙素有一定的负调控作用。骨钙素基因的启动子有三个 AP-1 区, c-Fos, c-Jun 复合物与 AP-1 区的结合,可能影响了骨钙素基因的启动、转录和翻译。本文结果为 c-Fos, c-Jun 参与骨代谢提供了直接证据,同时也为观测成骨细胞生长分化及其影响因素提供了有价值的指标,有助于促进牙周炎牙槽骨吸收机理及其它骨代谢相关研究。

本文图 1~图 6 见插页 1

参考文献

- 1 Dony C, Gruss P. Nature, 1987, 328: 711.
- 2 Lee K, Decds JD, Chiba S, et al. Endocrinology, 1994, 131: 411.
- 3 Candebere GA, Prud'homme J, St Arnaud R, et al. Mol Endocrinol, 1991, 5: 1780.
- 4 Clehny JC, Scott DK, Brakenhoff KD, et al. Mol Endocrinol, 1992, 6: 1831.
- 5 Lang H, Mertens T J. Oral Maxillofac Surg, 1990, 48: 696.

6 张炜良,于世凤,郑麟蕃,等.中华病理杂志,(195,24(3): 124.

7 王慧明,王模堂,王翰章,等.华西口腔医学杂志,1994,12(2):216.

8 Aubin JE, Turkson K, Heersche JNM. Cellular and Molecular Biology of Bone, Academic Press Inc, 1993: 1-14.

9 Grigoriadis AE, Wang ZQ, Wanger EF. Cellular and Molecular Biology of Bone, Academic Press Inc, 1993: 491-517.

10 Mercurian HL, Tour BL, Linkhart TA. Calcif Tissue Int, 1990, 46: 252.

11 Ruther V, Garber C, Konniewski D. et al. Nature, 1997, 385: 412.

12 Johnson RS, Spigelman BM, Papadonnoou V. et al, 1992, 71: 777.

延边地区 104 例糖尿病患者骨矿含量及骨密度的测定

朴莲善 李钟范 张长义 林星子

糖尿病患者由于胰岛素的绝对或相对缺乏,可继发骨质疏松,严重者可导致病理性骨折。目前用二维扫描单光子骨密度仪测定糖尿病患者骨矿含量(BMC)及骨密度(BMD)的报道甚少,对延边地区糖尿病患者的BMC与BMD的测定尚无报道。为此,我们对延边地区104例糖尿病患者进行了桡骨BMC与BMD的测定,为临床早期诊治糖尿病骨质疏松提供一定的理论依据。

本文对以WHO诊断标准确诊的104例糖尿病患者(年龄在26~69岁,平均51.6岁,病程在2个月~15年),及246例健康人进行BMC与BMD测定,采用核工业部北京核仪器厂生产的HB-6012型二维扫描单光子骨密度仪,以右侧前臂桡骨远侧15°处,桡骨中下1/3交界处为测定点,测定BMC与BMD。

结果表明,朝鲜族男性与朝鲜族女性糖尿病患者

BMC与BMD均低于正常对照组,汉族男性与汉族女性BMC与BMD均低于正常对照组。朝鲜族与汉族糖尿病之间BMC与BMD无差异(表1,表2)。

表2 朝、汉两民族女性糖尿病患者BMD测定结果

| 组别 | 例数 | 平均年龄 | BMD(g/cm ²) |
|---------|-----|------|-------------------------|
| 正常对照组 | 108 | 50.8 | 0.39±0.061 |
| 朝鲜族糖尿病组 | 25 | 51.2 | 0.357±0.067** |
| 汉族糖尿病组 | 24 | 51.5 | 0.321±0.078** |

注: ** P<0.01

表1 朝、汉两民族男性糖尿病患者BMD测定结果

| 组别 | 例数 | 平均年龄 | BMD(g/cm ²) |
|---------|-----|------|-------------------------|
| 正常对照组 | 140 | 47.5 | 0.506±0.065 |
| 朝鲜族糖尿病组 | 35 | 48.8 | 0.386±0.078** |
| 汉族糖尿病组 | 20 | 47.8 | 0.309±0.081* |

注: * P<0.05 ** P<0.01

本文通过测定延边地区朝、汉族糖尿病患者的BMC与BMD,可知糖尿病患者可继发骨质疏松。朝鲜族与汉族两个民族之间BMC与BMD无差异,这可能与饮食习惯、生活方式、生活环境等在延边地区朝、汉两个民族之间无明显差异有关。

糖尿病患者继发骨质疏松的机理尚不十分清楚。目前认为与胰岛素缺乏导致骨蛋白合成减少,基质合成障碍,骨盐减少,体内VitD结合蛋白降低,1,25-二羟D₃水平下降有关。另外糖尿病人肾小管对钙磷重吸收降低而致骨质疏松。文献报道,骨质吸收30%方能在X线上检出,因此,采用单光子骨密度仪测定BMC与BMD对早期诊断、早期预防,早期治疗糖尿病性骨质疏松有一定的临床意义。

c-Fos, c-Jun 在兔成骨样细胞内的表达

正文见第 30 页



图 1 成骨样细胞碱性磷酸酶染色阳性 300



图 2 成骨样细胞特殊培养 28 天后的钙茜素红染色 · 300



图 3 第一代成骨样细胞 c-Fos 阳性表达, 胞核、核膜、胞浆均可着色 150

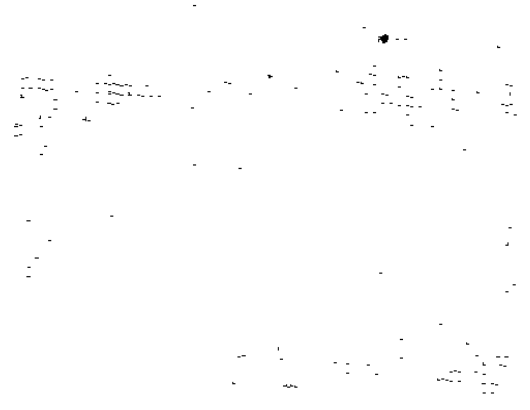


图 4 第十一代成骨样细胞 c-Fos 阳性表达, 但仅胞浆着色 · 150



图 5 第一代成骨样细胞骨钙素弱阳性表达 · 300

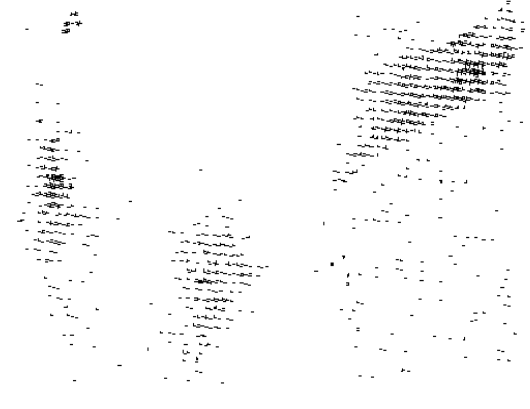


图 6 第六代成骨样细胞骨钙素阳性表达 · 300