

# 雌二醇对人成骨细胞增殖及基质金属蛋白酶活性的影响

杨学辉 孙德娟 李恩



**摘要** 本文报道了雌二醇对体外分离培养的人成骨细胞增殖的影响, SDS-Gel-PAGE 电泳及固体胶原-羟脯氨酸测定法测定成骨细胞基质金属蛋白酶(MMPs)活性。结果表明:低浓度雌二醇对人成骨细胞有刺激增殖的作用,  $1.3 \times 10^{-7} \text{M}$  时刺激作用最强, 浓度过高则抑制细胞增殖, 成骨细胞的分化则随着雌二醇浓度的增加而分化越好, 随雌激素浓度增加成骨细胞 MMP 活性也相应增大与分化程度一致。

**Effect of estrogen on proliferation and differentiation of human osteoblast and expression of matrix metalloproteinase *in vitro***

Yang Xuehui, Kong Dejuan, Li En

Department of Biochemistry, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

**Abstract** By use of cell culture techniques *in vitro*, we obtained human osteoblast and observed the proliferation and differentiation of human osteoblast and expression of matrix metalloproteinase (MMP). The result showed that estrogen stimulates cell proliferation at low concentration, induces cell differentiation and enhances MMP expression at high concentration.

雌激素调节骨代谢, 雌激素缺乏可导致动物及绝经后妇女的高转换型骨质疏松<sup>[1]</sup>。实验资料已表明雌激素受体存在于成骨细胞中<sup>[2]</sup>, 在体外可促进成骨细胞的增殖, 在体内可通过

成骨细胞产生细胞因子及基质金属蛋白酶影响破骨细胞的活性<sup>[3,4]</sup>。本文利用体外培养的人成骨细胞, 观察雌二醇对其增殖及分化的影响, 以进一步研究雌激素调节骨代谢的机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 人成骨细胞分离培养

取引产胎儿头盖骨, 用 0.25% 胰酶冲洗清除脂肪和软组织, 剪成  $1 \sim 3 \text{mm}^3$  的小块, 加 0.1% 胶原酶消化 45 分钟, 吸去胶原酶, 用无血清的 DMEM 培养基冲洗, 置 15% FCS-DMEM 培养基中贴壁培养。

### 1.2 雌二醇对人成骨细胞增殖分化的影响

0.25% 胰酶消化贴壁培养的细胞, 离心收

作者单位: 050017 石家庄, 河北医科大学生物化学教研室

作者简介: 杨学辉, 女, 1965 年 6 月出生于四川崇庆县, 1987 年 6 月毕业于兰州大学生物系生物化学专业, 此后于河北医科大学生物化学教研室任教, 1994 年河北医科大学生物化学专业硕士研究生毕业, 1997 年考取河北医科大学中西医结合基础理论研究室博士, 1997~1998 年于中国协和医科大学生物化学分子生物学室做 CMB 学者研究细胞凋亡及信号传导。1998 年获联邦医学教育奖学金, 现正从事博士研究工作, 主要研究方向是骨代谢疾病。

集细胞,用含 15%FCS 的 DMEM 调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个/ml,接种于 96 孔培养板上,0.2ml/孔,培养 24 小时细胞贴壁后,吸去培养基,分别加入无血清雌二醇浓度为  $0, 6.5 \times 10^{-9}, 6.5 \times 10^{-8}, 1.3 \times 10^{-8}, 1.3 \times 10^{-7}, 3.25 \times 10^{-7}, 6.5 \times 10^{-7}, 3.25 \times 10^{-6}$  M 的培养基 0.2ml,每种浓度 4 孔,继续培养 68 小时,吸出培养基用于 MMPs 酶活性及碱性磷酸酶活性的测定。每孔加入 0.1ml 无血清 DMEM,再加入 10 $\mu$ l MTT(浓度 5 mg/ml),继续培养 4 小时后,加入溶解液 0.1 ml/孔(40 g SDS 溶于 200 ml 50%二甲基甲酰胺-2%冰醋酸溶液)室温放置 2 小时后,于 570nm 处测光吸收,分析细胞增殖状况。采用氨基萘替比林测酚法测定碱性磷酸酶活性。

### 1.3 成骨细胞基质金属蛋白酶活性的测定<sup>[4]</sup>

用 1.2 中收集的培养基,在含 0.2%明胶的 SDS-PAGE 上电泳,电泳完毕,用 2.5% TritonX-100 洗涤 2 次,每次 15 分钟,蒸馏水洗涤 3 次,每次 5 分钟,然后加入 50 ml 反应液(50 mmol Tris,50 mmol CaCl<sub>2</sub>,pH 7.8)37℃摇

床反应 20 小时,吸出反应液,蒸馏水洗涤 3 次,每次 5 分钟,考马斯亮蓝染色,观察结果。

采用固体胶原法即成骨细胞培养上清 0.1 ml 加入 200  $\mu$ g 固体胶原在 50 mmol Tris,50 mmol CaCl<sub>2</sub>,500 mmol NaCl,pH 7.8 的缓冲液中 37℃水解 4 小时,(空白对照不加 CaCl<sub>2</sub> 改加 20 mmol EDTA)8000 r/min 离心去除沉淀,取上清 0.25 ml 加 6NHCl 0.25ml,120℃水解 15 小时后,用 NaOH 调 pH 6.0,测水解液羟脯氨酸量( $\mu$ mol/ml)估计 MMP 活性。

## 2 结果

### 2.1 雌二醇对成骨细胞增殖及分化的影响

如表 1 和 2 所示,低浓度的雌二醇对成骨细胞有刺激增殖的作用, $1.3 \times 10^{-7}$  M 刺激作用最强,浓度增加则细胞增殖率降低,以平均每 OD 值的 ALP 单位数来分析成骨细胞分化,发现低浓度雌二醇对成骨细胞分化影响不大,增加浓度可促进其分化, $1.3 \times 10^{-7}$  M 刺激时其作用最强。

表 1 雌二醇对人成骨细胞增殖的影响(570 nm OD 值)

| 雌二醇浓度(M) | 0                    | $6.5 \times 10^{-9}$ | $1.3 \times 10^{-8}$ | $6.5 \times 10^{-8}$ | $1.3 \times 10^{-7}$  | $3.25 \times 10^{-7}$ | $6.5 \times 10^{-7}$  | $3.25 \times 10^{-6}$ |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 第一次      | 0.394<br>$\pm 0.012$ | 0.330<br>$\pm 0.066$ | 0.375<br>$\pm 0.083$ | 0.406<br>$\pm 0.103$ | 0.515*<br>$\pm 0.017$ | 0.271*<br>$\pm 0.017$ | 0.256*<br>$\pm 0.024$ | 0.247*<br>$\pm 0.051$ |
| 第二次      | 0.388<br>$\pm 0.058$ | 0.311<br>$\pm 0.044$ | 0.429<br>$\pm 0.021$ | 0.419<br>$\pm 0.017$ | 0.475*<br>$\pm 0.040$ | 0.437<br>$\pm 0.019$  | 0.372<br>$\pm 0.029$  | 0.325<br>$\pm 0.042$  |
| 第三次      | 0.384<br>$\pm 0.072$ | 0.341<br>$\pm 0.061$ | 0.396<br>$\pm 0.019$ | 0.422<br>$\pm 0.018$ | 0.483*<br>$\pm 0.035$ | 0.429<br>$\pm 0.021$  | 0.359<br>$\pm 0.008$  | 0.319<br>$\pm 0.041$  |

注:与对照组比较 \*  $P < 0.05$

表 2 雌二醇对成骨细胞分化的影响

| 雌二醇浓度(M)  | 0                   | $6.5 \times 10^{-9}$ | $1.3 \times 10^{-8}$ | $6.5 \times 10^{-8}$  | $1.3 \times 10^{-7}$  | $3.25 \times 10^{-7}$ | $6.5 \times 10^{-7}$  | $3.25 \times 10^{-6}$ |
|-----------|---------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| ALP 活性(U) | 0.90                | 0.72                 | 0.90                 | 2.56                  | 3.76                  | 1.40                  | 1.12                  | 1.05                  |
| 第一次       | $\pm 0.009$<br>0.81 | $\pm 0.060$<br>0.64  | $\pm 0.075$<br>1.45  | $\pm 0.097$<br>2.04   | $\pm 0.014$<br>3.49   | $\pm 0.016$<br>2.42   | $\pm 0.021$<br>1.85   | $\pm 0.047$<br>1.43   |
| 第二次       | $\pm 0.012$<br>0.76 | $\pm 0.052$<br>0.84  | $\pm 0.081$<br>1.04  | $\pm 0.094$<br>2.27   | $\pm 0.037$<br>3.35   | $\pm 0.016$<br>2.35   | $\pm 0.031$<br>1.67   | $\pm 0.039$<br>1.49   |
| 第三次       | $\pm 0.068$<br>2.28 | $\pm 0.053$<br>2.20  | $\pm 0.017$<br>2.40  | $\pm 0.020$<br>6.31*  | $\pm 0.031$<br>7.30** | $\pm 0.024$<br>5.17** | $\pm 0.009$<br>4.37*  | $\pm 0.046$<br>6.07** |
| ALPu/OD   |                     |                      |                      |                       |                       |                       |                       |                       |
| 第一次       | $\pm 0.010$<br>2.08 | $\pm 0.065$<br>2.05  | $\pm 0.078$<br>3.37* | $\pm 0.099$<br>4.86*  | $\pm 0.012$<br>7.34** | $\pm 0.014$<br>5.53** | $\pm 0.023$<br>4.97*  | $\pm 0.046$<br>4.40*  |
| 第二次       | $\pm 0.024$<br>1.97 | $\pm 0.072$<br>2.46  | $\pm 0.079$<br>2.63  | $\pm 0.102$<br>5.37** | $\pm 0.041$<br>6.93** | $\pm 0.012$<br>5.47** | $\pm 0.027$<br>4.65** | $\pm 0.037$<br>4.67*  |
| 第三次       | $\pm 0.057$         | $\pm 0.049$          | $\pm 0.020$          | $\pm 0.021$           | $\pm 0.029$           | $\pm 0.026$           | $\pm 0.011$           | $\pm 0.051$           |

注:与对照组比较 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

## 2.2 对成骨细胞基质金属蛋白酶活性的影响

SDS-Gel-PAGE 法测定酶活性时,在 72KD 处呈现白色的条带,利用固体胶原酶法测定培养上清 MMP 水解固体胶原产生游

HPY 的量以估计酶活性,结果如表 3,雌激素可提高成骨细胞培养上清中 MMP 的活性,与成骨细胞增殖分化程度一致。

表 3 雌二醇对成骨细胞 MMP 活性的影响

| 雌二醇浓度(M)                  | 0           | $6.5 \times 10^{-9}$ | $1.3 \times 10^{-8}$ | $6.5 \times 10^{-8}$ | $1.3 \times 10^{-7}$ | $3.25 \times 10^{-7}$ | $6.5 \times 10^{-7}$ | $3.25 \times 10^{-6}$ |
|---------------------------|-------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| MMP 活性:                   | 0.099       | 0.093                | 0.128                | 0.158                | 0.237*               | 0.178*                | 0.140                | 0.135                 |
| 第一次( $\mu\text{mol/ml}$ ) | $\pm 0.029$ | $\pm 0.045$          | $\pm 0.089$          | $\pm 0.094$          | $\pm 0.023$          | $\pm 0.027$           | $\pm 0.034$          | $\pm 0.074$           |
|                           | 0.081       | 0.074                | 0.134                | 0.189                | 0.227*               | 0.176*                | 0.177*               | 0.149                 |
| 第二次( $\mu\text{mol/ml}$ ) | $\pm 0.017$ | $\pm 0.055$          | $\pm 0.108$          | $\pm 0.112$          | $\pm 0.032$          | $\pm 0.011$           | $\pm 0.037$          | $\pm 0.043$           |
|                           | 0.079       | 0.081                | 0.114                | 0.194*               | 0.215*               | 0.186*                | 0.163*               | 0.154                 |
| 第三次( $\mu\text{mol/ml}$ ) | $\pm 0.088$ | $\pm 0.051$          | $\pm 0.019$          | $\pm 0.027$          | $\pm 0.038$          | $\pm 0.034$           | $\pm 0.013$          | $\pm 0.039$           |

注:与对照组比较 \*  $P < 0.05$

## 3 讨论

在成年骨骼中,骨的重建仅发生在有骨吸收的部位,包括激活期,骨吸收期,骨形成期和静止期<sup>[5]</sup>。成骨细胞和破骨细胞的作用相互协调维持骨代谢的平衡。一般认为,成骨细胞主要负责骨形成,破骨细胞负责骨吸收,但二者又相互依赖相互促进其功能。体外实验发现纯化的破骨细胞不能形成骨吸收凹陷,加入成骨细胞后即能进行骨吸收。成骨细胞还能分泌 M-CSF 诱导破骨细胞的形成及维持其存活和功能<sup>[6]</sup>。骨吸收激素 PTH 的受体存在于成骨细胞中<sup>[7]</sup>,也说明这一点。在骨吸收过程中,骨基质蛋白的降解主要是基质金属蛋白酶的作用<sup>[8]</sup>,体外实验中加入四环素抑制 MMP 的合成,则不能形成骨吸收凹陷。骨吸收的首要条件是通过破骨细胞整合素受体吸附于骨表面,推测成骨细胞分泌 MMP 部分降解基质蛋白,暴露出整合素结合的 RGD 区,促进破骨细胞在骨表面的吸附,从而开始骨吸收过程。临床资料及动物实验表明,雌激素缺乏导致高转换型骨质疏松,雌激素替代可治疗绝经后骨质疏松,但其作用机理尚未十分清楚。本文以体外培养的人成骨细胞为材料,研究雌激素对成骨细胞增殖分化及 MMP 活性的影响,结果表明,雌激素可刺激成

骨细胞的增殖及分化,有利于成骨作用,提高 MMP 活性有利于降解基质蛋白促进破骨作用,与绝经后高转换型骨质疏松一致。

## 参 考 文 献

- 1 Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines and bone remodeling. *N Engl J Med*, 1995, 332, 305-311.
- 2 Eriksen EF, Colvard DS, Bery NJ, Graham ML. Estrogen-receptors in normal osteoblast-like cells. *Science*, 1988, 241:84-86.
- 3 Bord S, Horner A, Hembry RM, et al. Production of collagenase by human osteoblasts and osteoclasts *in vivo*. *Bone*, 1996, 19:35-40.
- 4 Mansell JP, Tariton JF, Bailey AJ. Expression of gelatinases within the trabecular bone compartment of ovariectomized and parathyroidectomized adult female rats. *Bone*, 1997, 20(6):533-538.
- 5 Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone; implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. *JCE M*, 1996, 81(10):3441-3447.
- 6 Fuller KJM, Owens CJ, Jagger A, et al. Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *J Exp Med*, 1993, 178:1733-1744.
- 7 Suda T, Nakamura I, Jimi E, et al. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(6):869-879.
- 8 Bord S, Horner A, Hembry RM, et al. Production of collagenase by human osteoblasts and osteoclasts *in vivo*. *Bone*, 1996, 19:35-40.