

抗骨质疏松药 XW630 对成骨细胞碱性磷酸酶 mRNA 表达的影响

尚德志 王大章 郑虎 翁玲玲 邓力

[摘要] 目的 研究新设计的抗骨质疏松药物 XW630 对成骨细胞碱性磷酸酶基因表达的影响,为其治疗骨代谢性疾病提供理论和实验依据。方法 以成骨细胞 MC3T3-E₁ 为体外实验模型,用含有 10^{-6} mol/L 浓度的 XW630,雌酚酮,四环素及四环素加雌酚酮的细胞培养液 DMEM 培养细胞,24 h 和 72 h 提取细胞总 RNA 并与碱性磷酸酶 cDNA 进行 Northern 杂交。结果 XW630 对成骨细胞 MC3T3-E₁ 合成和分泌碱性磷酸酶具有明显的促进作用。结论 XW630 具有明显的促进成骨作用。

Effect of antiosteoporosis drug XW630 on osteoblast gene expression Shang Dezhi, Wang Dazhang, Zheng Hu, et al. Jinzhou Medical College Liaoning Jinzhou 121001

[Abstract] **Objective** To find the effect of a new antiosteoporosis drug XW630 on alkaline phosphatase of gene expression and to support the theoretic and experimental basis for XW630 in treating the bone metabolic disease. **Methods** The osteoblasts MC3T3-E₁ were cultured *in vitro* with 10^{-6} mol/L XW630 containing culture medium, while estrogen and tetracycline were used as control drugs in the medium. The osteoblasts were cultured for 24 hours and 72 hours, the total RNA of osteoblasts was extracted, the alkaline phosphatase was used as cDNA probe and the Northern blot hybridization was done. **Results** The mRNA expression of osteoblast alkaline phosphatase could be promoted by XW630. **Conclusion** The metabolism of osteoblasts could be promoted by XW630.

原发性骨质疏松症是临床上最常见的一种代谢性骨疾病,多发生于绝经后妇女,其特点是在骨代谢过程中,骨吸收和骨形成之间的偶联出现缺陷,与内分泌紊乱、钙吸收不良和废用性有关,雌激素水平下降是骨质疏松症发病的重要原因。研究表明,成骨细胞含有特异性的雌激素受体,雌激素可以直接作用于成骨细胞^[1,2]。雌激素的缺乏使骨对甲状旁腺素(PTH)的敏感性增加,导致骨吸收增加,雌激素缺乏可直接或间接地降低降钙素(CT)的分泌,降低 1,25

(OH)₂D₃ 在血液中的含量,从而使骨量丢失^[3]。

四环素曾作为一种广谱抗生素而广泛应用于临床。经过长期的临床实践发现四环素对骨组织具有高度的亲合性,即与骨组织的钙盐结合而沉积于骨组织内,主要沉积在骨的活性部位。最近的研究认为,四环素对病理状况下骨组织的修复具有促进作用,对糖尿病引起的骨质疏松症具有潜在的治疗作用^[4]。

基于对雌激素直接促进骨形成和四环素对骨组织具有极强亲合力的认识,为降低雌激素在子宫、乳腺等非骨组织的浓度,预防和降低雌激素在治疗骨质疏松时所表现的副作用,XW630 课题组设计出新型抗骨质疏松药物 XW630,即将四环素与雌激素通过桥连接的方式而合成的新化合物。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39430122)

作者单位:锦州医学院口腔系(尚德志);华西医科大学口腔医学院(王大章);华西医科大学药学院(郑虎、翁玲玲、邓力)

本研究采用成骨细胞 MC3T3-E1 作为体外实验模型,加入 XW630 药物 24,72 h,提取细胞总 RNA,并与碱性磷酸酶 cDNA 探针进行狭缝杂交,从分子水平探讨 XW630 对成骨细胞代谢的影响及其促进成骨功能的机理,为其临床应用提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

新药 XW630 由华西医科大学药学院合成(中华人民共和国专利号 93110919.6, 93110939.1);雌酚酮、四环素;华西医大药学院骨质疏松研究实验室提供。含有碱性磷酸酶 cDNA 片段的质粒 DNA PTA153 由章锦才教授惠赠。

1.2 方法

细胞培养:以 D-MEM 加 10% 小牛血清为培养液,在 37℃,5%CO₂ 浓度,饱和湿度下培养成骨细胞 MC3T3-E1,经传代培养至实验所需数量。

实验分组:以 D-MEM 培养液分别稀释 XW630,雌酚酮,四环素及四环素加雌酚酮至 10⁻⁶mol/L 的浓度。弃原细胞培养液,换用上述 4 种药物作细胞培养液继续培养,每组细胞培养 10 瓶,每瓶细胞加 7 ml 药物培养液。加药后 24 h 和 72 h 终止培养,每次取 5 瓶细胞提取细胞总 RNA。

细胞总 RNA 的提取及 RNA 与 cDNA 杂交:细胞总 RNA 的提取采用柱提取法(gene company Ltd USA 产品,严格按照说明书的步骤完成),剪取适当大小的尼龙膜,以无菌双蒸水浸湿,再于 20 × SSC 室温浸润 1 h,用 0.1 mol/L 氢氧化钠清洗多孔点膜器,继以无菌双蒸水彻底冲洗,将用 20 × SSC 浸润过的滤纸平铺在点膜器上,再铺上尼龙膜,排除两者之间的气泡,夹紧点膜器,连接真空泵。取 10 × SSC 加满点样孔,抽滤 2 次。取 RNA 10 μg,依次稀释 5 倍,即 10 μg,2 μg,0.4 μg,甲酰胺 20 μl,37% 甲醛 7 μl,20 × SSC 2 μl,混匀,于 68℃ 水浴 15 min 后

冰浴冷却,再加入 2 倍体积 20 × SSC 200 μl,抽滤,反复 2 次,继续抽真空使尼龙膜干燥。取下尼龙膜在室温中晾干,置 120℃ 烤箱内 30 min,使样品 RNA 与尼龙膜交联。

将点样的尼龙膜于 6 × SSC 中完全浸润,放入塑料袋中,加入预杂交液 4 ml,68℃ 水浴保温 1 h。

取已经 DIG 标记的 actin-β 0.2 μg,于 100℃ 沸水浴中变性 5 min 立即冰浴,加入另外 4 ml 的杂交液中,并装入另一塑料袋内,迅速将已经过预杂交的尼龙膜转移至塑料袋内,封膜。在 68℃ 水浴摇床内,轻轻振摇 12~16 h。

杂交后,以 2 × SSC 和 0.1% SDS 于脱色摇床上洗 2 次,每次 20 min。用马来酸缓冲液,轻轻冲洗 5 min。在 30 ml 封闭液中孵育 30 min。转移至 7 ml anti-DIG-AP conjugate (7 mu/ml) 溶液中孵育 30 min,用 30 ml 马来酸缓冲液漂洗尼龙膜 2 次,每次 15 min。在 7 ml 反应缓冲液中平衡 2~5 min。将尼龙膜转移至 3 ml 着色液中,在暗室内孵育 16 h。取出尼龙膜,放入 50 ml 水中 5 min 以终止反应。将尼龙膜取出放在两张滤纸中间,于暗室内晾干。

待已显色的尼龙膜干燥后,在 Beckman CDS200 密度扫描仪上,以反射波,0.3 mm 窄缝,快速扫描,自动记录。

根据 actin-β 狭缝杂交后的情况来看,各组细胞总 RNA 的含量比较一致,以 2 μg RNA 的上样量较为合适。其余各组 RNA 的点膜,杂交程序同用 actin-β 探针的杂交。

2 结果

在成骨细胞 MC3T3-E1 中分别加入 XW630、雌酚酮、四环素以及四环素加雌酚酮,培养 24 h,结果发现 XW630、雌酚酮以及四环素加雌酚酮对成骨细胞碱性磷酸酶 (AKP) mRNA 的表达具有明显的促进作用;而单纯的四环素不影响成骨细胞碱性磷酸酶 mRNA 的表达。经狭缝杂交,密度扫描半定量分析表明: XW630 加入成骨细胞中培养 24 h,可使其碱性

磷酸酶 mRNA 的表达增加 3.6 倍,雌酚酮与四环素加雌酚酮分别加入成骨细胞培养 24 h,可分别使成骨细胞碱性磷酸酶 mRNA 的表达增加 2.8 倍和 2.6 倍。成骨细胞 MC3T3-E₁ 加入药物培养 72 h,其碱性磷酸酶 mRNA 的表达与加药后 24 h 相比,已明显降低,在整个实验期间,单纯的四环素对成骨细胞碱性磷酸酶 mRNA 的表达没有明显作用。

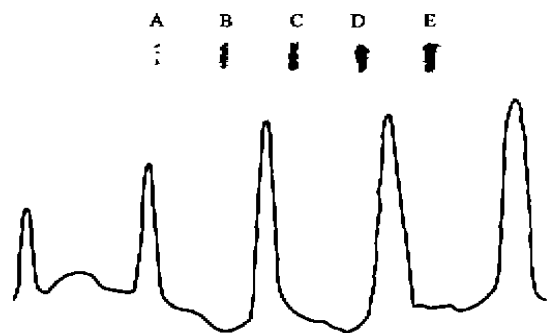


图 1 成骨细胞 MC3T3-E₁ 加入药物培养液培养 24 h,细胞总 RNA 与碱性磷酸酶 cDNA 探针狭缝杂交及密度扫描分析
注:A:对照 B:四环素 C:四环素加雌酚酮 D:雌酚酮 E:XW830

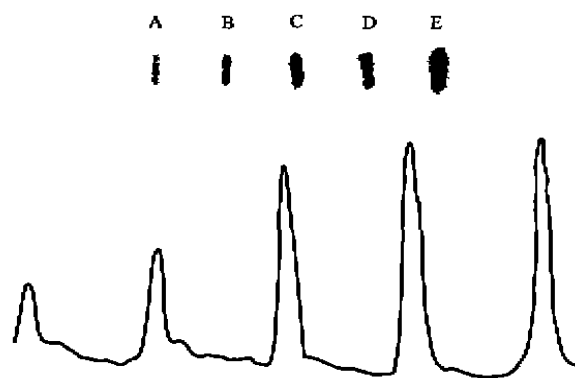


图 2 成骨细胞 MC3T3-E₁ 加入药物培养液培养 72 h,细胞总 RNA 与碱性磷酸酶 cDNA 探针狭缝杂交及密度扫描分析
注:A:对照 B:四环素 C:四环素加雌酚酮 D:雌酚酮 E:XW630

3 讨论

骨质疏松症是老年人的多发病,其骨量减

少常随年龄的增长而加重。据美国国立牙科研究所(NIDR)1993 报告,在美国目前约有 2 000 万骨质疏松症患者,其中大部分为女性,在这些患者中约有 150 万人发生骨折,每年耗费医疗费 10 亿美元。据日本 1980 年报告资料,约有 400 万骨质疏松症患者,其中发生股骨颈骨折者约为 10 万人^[1]。虽然,目前我国尚无骨质疏松症的统计资料,但我国已跨入老年社会的行列,加之人口基数大,故推算我国目前患骨质疏松症的数目不会少于国外。因此研制一种安全有效地治疗骨质疏松症的方法是国内外学者正在努力探讨的重要课题。

自 40 年代 Albright^[2]在绝经后妇女中首次观察到雌激素缺乏与骨质丢失存在一定联系,并提出雌激素水平下降是绝经后易发生骨质疏松症和骨质疏松性骨折的病因之后。人们从不同角度对雌激素在骨组织生长代谢过程中的作用进行了不断地探索。Lindsay^[3]认为,雌激素的主要作用是减少骨吸收,从而阻止骨量的丢失。Takano-Yamamoto^[4]则认为:切除卵巢后应用雌激素,可增加成骨细胞数量,促进骨形成。Steinberg^[5]在为期 5 年的前瞻性研究中,发现绝经后妇女的骨密度显著下降,其体重、游离睾酮的对数值(LogFT)、游离睾酮的百分比(FT%)以及游离雌二醇的百分比(FE₂%)与骨密度呈正相关;性激素结合蛋白的对数值(LogSHBG)与骨密度呈负相关;雌二醇和睾酮较绝经前低,提示骨密度在妇女绝经期开始下降,可能是由于雌二醇和睾酮的不足所致。Heaney^[10]提出,雌激素可提高破骨细胞对甲状旁腺激素(PTH)的反应阈,因此机体必须分泌更多的 PTH 才能维持破骨细胞正常的功能。而 PTH 的增加将促进肠钙的吸收和减少尿钙的排泄。其结果是雌激素使血钙浓度维持在一定水平。当妇女绝经后,雌激素缺乏使破骨细胞活性增加,骨吸收加速,同时 PTH 分泌减少,维生素 D 活化受阻,1,25-(OH)₂D₃ 生成减少,最终导致骨质疏松。

虽然雌激素对骨形成具有明显的促进作用

已经得到了理论和实践的证实,而且也多数学者所认同,但是,由于成骨细胞与子宫内膜和乳腺所含雌激素受体的结构同源性,致使应用雌激素治疗骨质疏松症的病员罹患子宫内膜癌和乳腺癌的危险性增加。有研究报道,应用雌激素治疗骨质疏松症,可使患者并发子宫内膜癌和乳腺癌的危险性增加 2.8~15 倍。从而极大地限制了它在临床上的广泛应用。如何利用雌激素的成骨作用而减少其在非骨组织的副作用,是学者们长期思考,并努力研究解决的一个重要问题。经过学者们的长期努力,已研制出多种变构的雌激素,使其副作用有所下降。但是由于骨与非骨组织雌激素受体的同源性,其对非骨组织的副作用仍未能得到很好地控制,正是在这一背景下,XW630 课题组根据四环素对骨组织的极强亲合性和潜在的成骨能力,设计并合成了新型抗骨质疏松药 XW630,即将雌激素与四环素通过桥连接的方式连接起来,并保持各自的功能基团不变,使之主要作用于骨系统,而对非骨系统的作用极度降低。

本实验结果表明,XW630 在 10^{-6} mol/L 浓度下,加入成骨细胞 MC3T3-E₁ 中 24 h 可以使成骨细胞碱性磷酸酶 mRNA 的表达增加 3.6 倍。而且其作用明显优于雌酚酮和四环素与雌酚酮的单纯相加。产生这一结果的药理机制尚不明确。可能是在药物合成过程中激活了某一或某些活性基团;或者是药物变构后更易于与成骨细胞上的受体结合等等。总之其详细的药理机制还待进一步研究。另外,XW630 课

题组的其他实验显示,该药在子宫和乳腺的分布极少。这就预示着该药有可能成为临床上广泛用的新一代抗骨质疏松和促进骨修复的药物。

参 考 文 献

- 1 Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science*, 1988, 214(4861): 81.
- 2 Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, et al. Estrogen binding receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcomas cells. *Science*, 1988, 214(4861): 81.
- 3 Selby PL, Peacock M. Ethinyl estradiol and norethindrone in the treatment of primary hyperparathyroidism in postmenopausal women. *N Engl J Med*, 1986, 314(23): 1481.
- 4 Sasaki T, Kaneko H, Ramamurthy NS. Tetracycline administration restores osteoblast structure and function during experiment diabetes. *Anat Res*, 1991, 231(1): 25.
- 5 于世凤, 史凤芹, 章魁华. 骨质疏松症与颌骨. *现代口腔医学杂志*, 1995, 9: 38.
- 6 Albright F, Smith PH, Richardson AM. Postmenopausal osteoporosis: its clinical features. *JAMA*, 1941, 116: 2165.
- 7 Lindsay R. Hormone replacement therapy for prevention and treatment of osteoporosis. *Am J Med*, 1997, 95(3A): 37.
- 8 Takano-Yamamoto T, Rodan GA. Direct effects of 17 β -estradiol on trabecular bone in ovariectomized rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 2172.
- 9 Sternberg KK, Freni-Titulaer LW, Depuey EG, et al. Sex steroids and bone density in premenopausal and menopausal women. *Am J Clin Nutr*, 1997, 30: 1603.
- 10 Henney RP, Pecker RR, Saville PD. Calcium balance and calcium requirement in middle-aged women. *Am J Clin Nutr*, 1997, 30: 1603.

骨质疏松七届年会、钙剂四届年会近期将在杭州召开

经上级批准,第七届全国骨质疏松年会暨第四届全国钙剂年会定于 2000 年 9 月 15~20 日在浙江省杭州花园大酒店举行。获继续教育学分 20 分。热烈欢迎各有关专家和同行、有关厂家和公司参加。如需了解大会具体事项,请来信来电索取会议通知。

联系人:孙继荣 主任 电话:(010)64985881、64978180

传 真:(010)64976421 E-mail:cgsoe@hns.cjfh.ac.cn

通信地址:北京市朝阳区惠新里 38 号 邮编:100029

单位名称:中国骨质疏松杂志社