

酪氨酸激酶途径在成骨细胞增殖及 c-fos 表达中的作用

童安莉 陈璐璐 丁桂芝 张澈

[摘要] 目的 探讨酪氨酸激酶信息传递途径在成骨细胞增殖及 c-fos 表达中的作用。方法 采用阶段性酶消化法分离培养新生大鼠颅盖骨成骨细胞,用 MTT 法观察成骨细胞增殖,用免疫组化 SP 法结合计算机图像处理系统检测成骨细胞 c-fos 表达。结果 酪氨酸激酶抑制剂 Genistein 和 Herbimycin A 抑制成骨细胞增殖,且两者均部分阻断血清刺激的成骨细胞 c-fos 表达。结论 血清刺激和维持成骨细胞增殖及诱导 c-fos 表达均涉及酪氨酸激酶信息传递途径。

[关键词] 酪氨酸激酶抑制剂 成骨细胞 增殖 c-fos

Involvement of tyrosine kinase pathway in proliferation and c-fos expression of osteoblasts. Tong Anli, Chen Lulu, Ding Guizhi, et al. Department of Endocrinology, Union Hospital of Tongji Medical University, Wuhan 430022, China

[Abstract] **Objective** To study the signal transduction pathway in the proliferation and c-fos expression of osteoblasts. **Methods** Osteoblastic cells from rat calvaria were isolated by sequential enzymatic digestion. The proliferation of osteoblasts was measured by tetrazolium salt (MTT) method, and c-fos expression of osteoblasts was detected by immunohistochemistry combined with computer-based image analysis. **Results** Both genistein and herbimycin A, the inhibitors of tyrosine kinase, inhibited proliferation of osteoblasts, and they both partly blocked the c-fos expression induced by fresh serum. **Conclusion** Tyrosine kinase pathway is involved in the proliferation and c-fos expression of osteoblasts induced by serum.

[Key words] Tyrosine kinase inhibitor; Osteoblasts; Proliferation; c-fos

近几年,国内外对胞外信号激活细胞基因转录所要经历的信息传递途径的研究取得了很大进展。胞外信号由细胞表面传入细胞核,激活转录因子,而后者调控靶基因的转录^[1]。c-fos 由原癌基因 c-fos 编码,参与转录因子 AP-1 的组成,调节细胞的生长分化^[2]。c-fos 的成骨细胞增殖期高表达,而在分化期低表达或没有表达,影响成骨细胞的增殖、分化,尤其与成骨细

胞的增殖激活密切相关^[3,4]。血清中含有生长因子、激素等成分,能刺激和维持体外培养细胞的增殖生长。本实验研究血清诱导成骨细胞增殖及 c-fos 表达的信息传递机理,探讨其中可能涉及的酪氨酸激酶途径。

1 材料和方法

1.1 主要试剂: α -MEM 培养基、胎牛血清 (FCS) 购自 Gibco 公司。Genistein、Herbimycin A、胰蛋白酶、I 型胶原酶、MTT 购自 Sigma 公司。c-fos 抗体为 Santa Cruz 公司产品。

1.2 成骨细胞分离及培养: 取出生 24 h 的 SD

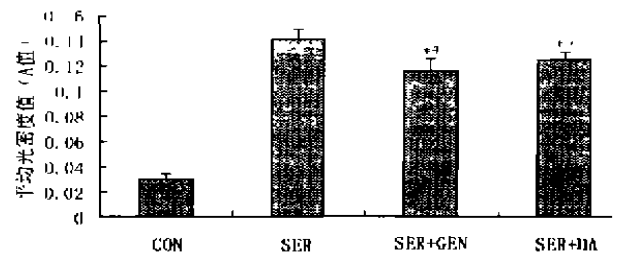
大鼠,无菌操作下取出颅盖骨,剥离去除软组织与骨膜,用无血清 α -MEM 培养基洗两次后,将其剪碎,然后进行阶段性酶消化:加入 0.2% 的 1 型胶原酶和 0.1% 的透明质酸酶 37℃ 搅拌消化 20 min,如此反复消化 5 次,共收集 5 批细胞,前 2 批细胞弃去不用,后 3 批细胞收集后,用 α -MEM 冲洗细胞 1 次,将细胞悬浮于 α -MEM 培养基中(含 10% FCS,青、链霉素各 100 U/ml)接种于培养瓶中,置于 37℃、饱和湿度,5% CO_2 的培养箱中培养。24 h 后,更换培养基继续培养,以后每隔 2 d 更换培养基 1 次,待细胞接近融合时用 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 将细胞从瓶底消化下来,加入含 10% FCS 的培养基吹打成细胞悬液,调整细胞浓度,将细胞以 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的细胞密度接种于 96 孔培养板和装入消毒好的盖玻片的 6 孔培养板中。

1.3 细胞增殖测定:成骨细胞在含 10% FCS 的 α -MEM 中生长 24 h,换用新鲜的含 10% FCS 的 α -MEM,同时分别加入处理因素(Genistein 浓度分别为 10 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$;Herbimycin A 浓度分别为 10 ng/ml、50 ng/ml、200 ng/ml)并设对照组(只加入新鲜 10% FCS 的 α -MEM),再培养 24 h,吸出培养基,加入 MTT 溶液(1 mg/ml)100 μl /孔,置 37℃ 温箱中孵育 3 h,细胞内出现蓝紫色甲臆晶体,然后,每孔加入 100 μl 甲臆提取液(20% SDS),4℃ 冰箱过夜,使细胞内的蓝紫色甲臆晶体完全溶解,酶标仪在 570 nm 波长处测 A 值。用 MTT 和甲臆提取液作空白对照。MTT 法测定的 A 值与增殖细胞数量呈线性关系。

1.4 c-fos 免疫组化(SP 法)染色:成骨细胞在装有盖玻片的 6 孔板中培养 24 h,吸出培养基,洗板两次后,随机分为 4 组(每组接种盖玻片 4 张):对照组加不含 FCS 的 α -MEM;SER 组加含 10% FCS 的 α -MEM;SER+GEN 组加含 100 $\mu\text{mol/L}$ Genistein 及 10% FCS 的 α -MEM;SER+HA 组加入含 200 ng/ml Herbimycin A

及 10% FCS 的 α -MEM,继续培养 2 h 后取出盖玻片,进行 c-fos 的免疫组化染色。具体步骤如下:1% 的多聚甲醛固定 10 min。0.1% Triton X-100-PBS,常温下 20 min。3% H_2O_2 室温 20 min。10% 正常羊血清(NSS)室温过夜。加生物素化羊抗兔(1:100)37℃,40 min。加辣根酶标记链霉卵白素(1:100)37℃,40 min。加 DAB· H_2O_2 溶液,镜下显色至满意,自来水冲洗,双蒸水漂洗。以上各步骤间均用 PBS 振洗,5 min×3。常规脱水、透明、树胶封片。用 PBS 代替一抗作阴性对照。

免疫组化染色结果半定量分析:每组随机选取 20 个细胞,用同济太阳 500 彩色多媒体图像处理系统,测试着色平均光密度值。



按干预因素分组

图 1 酪氨酸激酶抑制剂对血清刺激成骨细胞 c-fos 表达的影响

注:SER 组、SER+GEN 组、SER+HA 组与对照组比, * $P < 0.01$; SER+GEN 组、SER+HA 组与 SER 组比, # $P < 0.05$

1.5 统计分析:实验结果以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间进行 t 检验。

2 结果

2.1 酪氨酸激酶抑制剂对成骨细胞增殖的影响:Genistein、Herbimycin A 作用成骨细胞 24 h,用 MTT 法检测成骨细胞数量所得的 A 值,在对照组为 0.155 ± 0.005 ,Genistein 10 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 组分别为 0.144 ± 0.026 、 0.143 ± 0.007 和 0.135 ± 0.014 ,其中后两组数值与对照组比较经统计学分析,差异有显著性($P < 0.05$);Herbimycin A 10 ng/ml、50 ng/ml、200 ng/ml 组测定值分别为 $0.154 \pm$

0.023、0.122±0.019 和 0.116±0.007,其中后两组数值与对照组比较经统计学分析,差异有非常显著性($P<0.01$)。这一结果表明:Genistein、Herbimycin A 均抑制成骨细胞增殖。

2.2 酪氨酸激酶抑制剂对血清诱导成骨细胞 c-fos 表达的影响:对照组及处理组的成骨细胞内均有黄褐色染色颗粒,表明成骨细胞中有 c-fos 表达。将 c-fos 免疫组化染色进行图像分析,平均光密度测量(见图1)显示,Genistein、Herbimycin A 均部分阻断血清刺激的成骨细胞 c-fos 表达。

3 讨论

细胞内酪氨酸激酶种类很多,参与介导胞外信号的信息传递,与细胞的增殖、分化、存活密切相关。Genistein 和 Herbimycin A 均是酪氨酸激酶抑制剂,但对其所抑制的具体酪氨酸激酶目前还不清楚。酪氨酸激酶传递途径主要包括:受体和非受体酪氨酸激酶→Ras 蛋白→MAPKKK(如 Raf₁)→MAPKK→MAPK→底物→基因转录 DNA 合成^[5,6]。血清中含有生长因子及激素,很多生长因子受体都是酪氨酸激酶,可以通过以上的级联系统将信号传递到细胞核内,调节转录因子的产生而最终调控基因表达。c-fos 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。其蛋白质产物在刺激后 1~2 h 表达达到高峰,c-fos 与 c-jun 结合可形成转录因子 AP-1 复合物。在对其他细胞的研究表明 MAPK 可激活 c-fos 基因表达^[2,7],而对在成骨细胞中诱导 c-fos 表达的信号传递机理的研究报道较少。

近几年,体内、外实验及转基因动物研究发现,c-fos 表达对骨转换有重要意义,严格调控 c-fos 的表达对正常骨代谢很重要^[8,9]。已有实验证明,甲状旁腺激素(PTH)^[10]、前列环素(PGI₂)^[11]、胰岛素样生长因子(IGF)^[12]、转化生长因子 β (TGF β)^[13]均诱导 c-fos 原癌基因的表达,同时这些因子又影响成骨细胞的增殖,且用 c-fos 反义核苷酸能阻断 TGF β 的致有丝分

裂作用。由此证明,c-fos 表达在调控成骨细胞增殖中起重要作用。现已证明,c-fos 在成骨细胞增殖期高表达,在分化期低表达或没有表达,与成骨细胞增殖激活有关^[3]。在对其他细胞系的研究中发现抑制 c-fos 表达不仅阻断细胞由 G₀ 期向 G₁ 期转化,还能抑制对数生长期细胞的增殖^[4,15]。

本研究发现酪氨酸激酶抑制剂 Genistein、Herbimycin A 能抑制成骨细胞增殖,且部分阻断血清刺激的 c-fos 表达,由此证明血清刺激和维持成骨细胞增殖及诱导 c-fos 表达均涉及酪氨酸激酶途径。对血清通过酪氨酸激酶途径刺激 c-fos 表达增加及后者作为转录因子的组成部分而最终诱导与细胞增殖有关基因的表达并促进增殖的推测还有待进一步研究证实。血清刺激细胞增殖的信息传递途径很复杂,很可能同时包括其他一些与 c-fos 表达无关的促增殖的信息传递机制。本研究结果可以为进一步认识成骨细胞增殖的分子机制提供帮助。

参 考 文 献

- 1 Karin M. Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcriptional factors. *Curr Opin Cell Biol*, 1994; 6: 115-120.
- 2 Janknecht R. Regulation of c-fos promoter. *Immunobiol*, 1995; 193: 137-142.
- 3 Lian JB, Stein GS. Osteoclast biology. In Robert M, David F, Jennifer K, eds. *Osteoporosis*. San Diego, California, U. S. A: Academic Press, 1996; 23-59.
- 4 McCabe LR, Kockx M, Lian J, et al. Selective expression of fos and jun-related genes during osteoblast proliferation and differentiation. *Exp Cell Res*, 1995; 218: 255-262.
- 5 Kyriakis JM, App b, Zhang XF, et al. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, 1992; 358: 417-421.
- 6 Keyse SM. An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta*, 1995; 1265: 152-160.
- 7 Mehmet H. Regulation of c-fos expression in Swiss 3T3 cells; an interplay of multiple signal transduction pathways. *Br Med Bull*, 1991; 47: 75-86.
- 8 Dony C, Gruss P. Proto-oncogene c-fos expression in growth regions of fetal bone and mesodermal web tissue. *Nature*, 1987; 328: 711-714.

(下转第 26 页)