

人成骨细胞体外培养、鉴定及护骨素表达的研究

苏欣 廖二元 罗湘杭

【摘要】 目的 用酶消化法从正常人松质骨中分离成骨细胞,进行体外培养和功能鉴定,观察用 17β -雌二醇(17β -E₂)和雌激素受体拮抗剂 ICI182780 处理后,成骨细胞中护骨素(OPG)的表达变化。**方法** 用胰酶-胶原酶消化法从正常人松质骨中分离培养成骨细胞,I型胶原染色用 Van Gieson 法,钙化结节用茜素红染色,用钙钴法显示成骨细胞中碱性磷酸酶的表达,骨钙素和 OPG 基因的表达用 RT-PCR 检测,OPG 蛋白用 Western Blot 检测。**结果** 用酶消化法分离的人成骨细胞,在体外培养时可维持合成 I 型胶原、碱性磷酸酶、骨钙素,并形成钙化结节等功能;体外培养的人成骨细胞表达 OPG, 17β -E₂ 上调其表达,并能被雌激素受体拮抗剂 ICI182780 阻断。**结论** 用酶消化法进行人成骨细胞培养,方便易行,可培养大量高纯度人成骨细胞供研究使用; 17β -E₂ 上调 OPG 表达,而绝经后雌激素缺乏时,OPG 的表达相应减少,可能是骨质疏松的发病因素之一。

【关键词】 人成骨细胞; 酶消化法; 鉴定; 护骨素

In vitro study of expression of osteoprotegerin in human osteoblasts SU Xin, LIAO Er' yuan, LUO Xiang-hang. Institute of Endocrinology & Metabolism, The Second Hospital of Xiangya Medical College, Central-South University, Changsha 410011, China

【Abstract】 Objective To culture and identify the functions of human osteoblasts(HOB) *in vitro*, the cells were harvested from the trabecular bone of normal subjects. Then the expression of osteoprotegerin(OPG) in the HOB cells treated with 17β -estradiol and antiestrogen reagent ICI182780 was investigated. **Methods** The HOBs were isolated from the trabecular bone by trypsin and collagenase digestion. Type I collagen, mineralized nodes and the expression of alkaline phosphatase were studied by van Gieson's staining, alizarin red staining and modified Gomori method respectively. The expression of osteocalcin and OPG mRNA were examined by semiquantitative RT-PCR and OPG protein by Western blot. **Results** The HOBs purified by enzyme digestion *in vitro* functioned normally as observed *in vivo*; OPG was expressed by the HOBs and could be upregulated by 17β -estradiol, and this effect could be blocked by ICI182780, an antagonist of estrogen receptors. **Conclusion** It is easy to purify plentiful HOBs with normal functions by enzyme digestion, and the expression of OPG in HOBs is down-regulated under the condition of estrogen deficiency.

【Key words】 Human osteoblast(HOB) cells; Enzyme digestion; Identification; Osteoprotegerin

绝经后骨质疏松症主要是雌激素不足引起骨转换加快,骨重建呈负平衡,导致骨量丢失。雌激素替代治疗(HRT)是目前防治本病的常用方法,但雌激素作用的细胞机制尚未明确。近年来发现成骨细胞能分泌一种抑制破骨细胞形成和活化的细胞因子-护骨素(osteoprotegerin, OPG)^[1],对 OPG 表达的调节可能是多种激素、细胞因子对骨代谢调节的机制之一。本实验用改良的胰酶-胶原酶序贯消化法^[2],从成人骨组织中纯化成骨细胞并予功能鉴定;在此基础上,应用 17β -雌二醇及雌激素受体拮抗剂

ICI182780 干预成骨细胞,观察对 OPG 的表达调节,探讨 OPG 与绝经后骨质疏松的关系。

材料和方法

1. 细胞培养

(1)人成骨样细胞(HOB)的培养:外科手术取成人(30~50岁无骨代谢疾病的骨折患者髂骨或股骨头)的松质骨1~2g,去除外膜结缔组织,剪成2mm³大小碎粒,PBS冲洗3次,用0.25%胰酶-EDTA37℃消化两次,每次20min,弃去消化液,继用1mg/ml IV型胶原酶(Sigma公司)于37℃消化5次,反复振荡,每次20min,弃除前两次消化上清液,取最

后3次消化液,离心(1 200r/min)10min,弃上清液后用含15%胎牛血清(PBS)的MEM培养液重悬细胞,接种于75 cm × 75 cm培养瓶,于37℃,5% CO₂条件下培养,次日换液弃去悬浮细胞,每隔两日换液1次;消化后的骨碎片可贴于25 cm × 25 cm培养瓶壁(25~40个碎骨粒/瓶),加入含15% FBS的MEM培养液,37℃,5% CO₂条件下培养,1周后换液,以后隔两日换液1次,即得到酶消化法及骨片贴附法所获得成骨样细胞。

(2)雌激素干预试验:HOB细胞接种于25 cm × 25 cm培养瓶(第2代),用无酚红MEM培养液(含15% FBS、VitC50 μg/ml、青霉素50 U/ml、庆大霉素50 μg/ml)培养,汇合后换含0.1%牛血清白蛋白(BSA)的无血清MEM培养液培养48h,再用17β-E₂ (Sigma公司)和ICI182780 (Tocris Cookson公司)分6组进行干预:①对照;②E₂ 10⁻¹⁰ M;③E₂ 10⁻⁸ M;④E₂ 10⁻⁶ M;⑤ICI182780 10⁻⁸ M;⑥ICI182780 10⁻⁷ M + E₂ 10⁻⁸ M。48h后抽提细胞总RNA和蛋白质行RT-PCR和Western blot杂交操作。

2. 成骨细胞功能鉴定^[3]

将原代HOB细胞用0.25%胰酶消化,以3 × 10⁵/ml密度接种于6孔板中,每隔两日用MEM培养液(含15% FBS、VitC50 μg/ml)换液,用于观察钙化结节形成的细胞,在接种后第6天开始,每次换液时,在上述MEM培养液中另加入10mM β-磷酸甘油钠。第20天时进行细胞功能鉴定。

(1)I型胶原染色:HOB细胞用PBS洗3次,4%多聚甲醛固定10min,Weigert铁苏木素染液染色5min, van Gieson苦味酸酸性复红染液染色5min, 95%乙醇快速分化、脱水,倒置显微镜下观察并摄像。

(2)钙化结节染色:细胞固定后,用0.1%茜素红染色5min,蒸馏水洗3次,乙醇脱水,镜下观察并摄像。

(3)碱性磷酸酶染色:细胞固定后入孵育液(0.5% β-磷酸甘油钠、0.5%巴比妥钠、0.9%氯化钙、0.04%硫酸镁),于37℃孵育4h,2%硝酸钴作用5min,1%硫化胺处理1min,乙醇脱水,镜下观察并摄像。另设阴性对照,孵育液中不含β-磷酸甘油钠。

(4)骨钙素检测:用RT-PCR检测BGP基因的表达。

3. 总RNA抽提和RT-PCR

细胞用Trizol(Gibco公司)抽提总RNA,取1 μg

总RNA用逆转录试剂盒(Promega公司)合成cDNA,再在Gene Amp2 400 PCR扩增仪上行PCR,同时扩增OPG、骨钙素(BGP)和β-actin(内对照)。OPG正向引物:5'-AACCCACAGA GCGAAATAC-3'反向引物:5'-AAGAATGCCTCCTCACAC-3',扩增产物为219 bp;BGP正向引物5'-GGGCAGCGAGGTAGTGAAGA反向引物:5'-CAAGGGGAAGAGGAAAGAAGG-3',扩增产物256 bp;β-actin正向引物:5'-CCT CGC CTT TGC CGA TCC-3'反向引物:5'-GGATCT TCA TGA GGT AGT CAG TC-3',扩增产物620 bp。扩增条件:[Mg²⁺]1.5 mM,退火温度58℃,35个循环。PCR产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后拍照。

4. 免疫印迹

Western杂交操作参照文献[3],取40 μg细胞总蛋白点样于8% SDS-PAGE胶电泳分离,电转至硝酸纤维素膜,再用OPG兔抗(晶美生物技术公司)杂交,检测OPG蛋白质表达,ECL法显示免疫复合物。

5. 统计方法:定量指标用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

结 果

1. HOB形态、功能鉴定:用酶消化法获得的HOB,镜下形态呈纺锤形、多边形、类梭形,在体外培养可合成大量I型胶原,胞外胶原致密, van Gieson染液染色呈红棕色(图1);细胞在维生素C、β-磷酸甘油钠存在条件下,可使胞外基质矿化,形成多量矿



图1 HOB I型胶原染色阳性(van Gieson法) × 100

化结节,茜素红染色呈红色(图2);细胞合成的碱性磷酸酶经改良的钙钴法(Gomori法)染色呈棕黑色细微颗粒(图3A),阴性对照(图3B)细胞内无棕黑微粒,在高倍显微镜下任选10个视野,每个视野计数

100 个细胞(以含棕黑色细微颗粒细胞为 HOB), 计

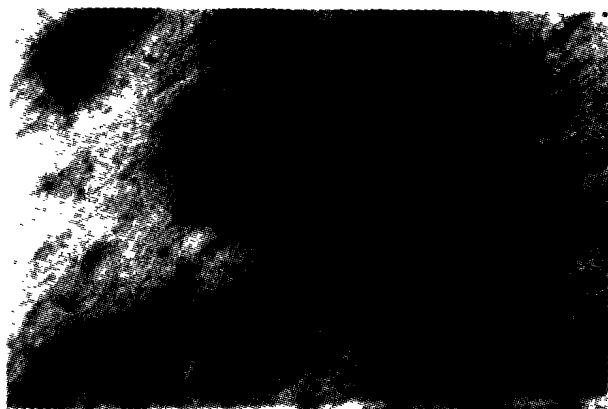


图 2 HOB 矿化结节染色阳性(茜素红染色法) $\times 100$

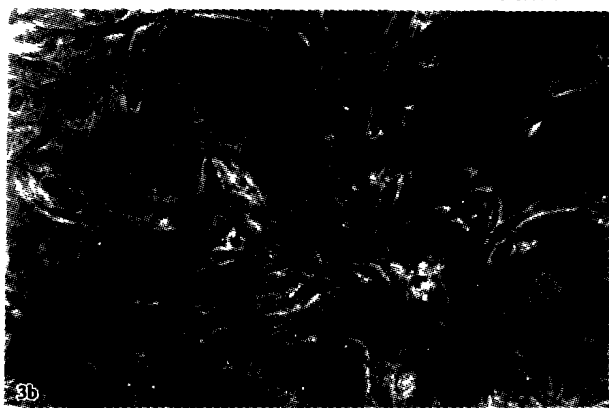
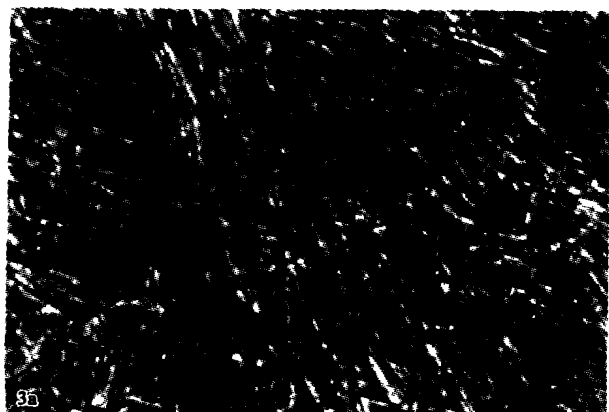


图 3 HOB 碱性磷酸酶染色(钙钴法) $\times 200$

3a 染色细胞 3b 阴性对照

算 HOB 纯度, 纯度为 $91.8\% \pm 7.45\%$; RT-PCR 法显示分离培养的细胞表达 BGP mRNA (图 4)。说明用酶消化法可方便地从成人骨组织中获得大量、高纯度的 HOB, 并保持了其在体内的功能, 可用于进一步的研究。

2. HOB 中 OPG mRNA 表达: RT-PCR 显示 (图 5), 17β -E₂ 可增加 HOB 中 OPG mRNA 的表达, ICI182780

则可阻断此作用, 而 ICI182780 10^{-8} M 本身并不降低 OPG mRNA 的表达。

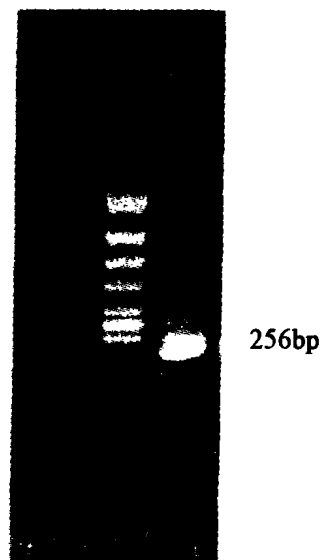


图 4 HOB 中骨钙素 mRNA 的表达

3. HOB 中 OPG 蛋白质的表达: Western Blot 杂交显示 (图 6), 各干预浓度的 17β -E₂ 及 ICI182780 均可使 HOB 中 OPG 蛋白质的表达增加, 但 17β -E₂ 与 ICI182780 共同干预时, OPG 蛋白质的表达反而下降。

讨 论

护骨素(OPG)基因是 1997 年 Simonet 等^[1]在对大鼠小肠 cDNA 测序时发现的, 可编码 401 个氨基酸残基组成的蛋白质。予 4 周龄雄 BDF1 小鼠皮下注射 OPG (10 mg/kg/d), 可使小鼠胫骨干骺端松质骨量增加 3 倍, 对去卵巢 Fisher 大鼠注射此蛋白可对抗雌激素下降所致的骨量丢失。Bucay 等^[4]建立了 OPG 基因突变(OPG^{-/-})小鼠模型, 突变小鼠出生后出现渐进加重的全身性骨质疏松, 骨组织学显示骨小梁减少, 骨皮质菲薄。研究表明, OPG 在成骨细胞中高表达, 是破骨细胞分化、活化的负性调节因子, 进而对骨吸收有抑制作用。OPG 的表达也受其他激素、细胞因子调节^[5], 本研究证实 17β -E₂ 可增加 HOB 中 OPG 表达, 此效应可为雌激素受体拮抗剂 ICI182780 所阻断, 提示 17β -E₂ 是直接通过雌激素受体(ER)途径对 OPG 表达予以调节。 17β -E₂ 对 OPG 表达的这种上调作用, 表明 OPG 与绝经后骨质疏松的发病有关, 绝经后雌激素水平降低, OPG 水平可能随之降低, 解除了对破骨细胞的抑制, 这可能是

绝经后早期骨吸收增加、骨量丢失增快的重要原因。

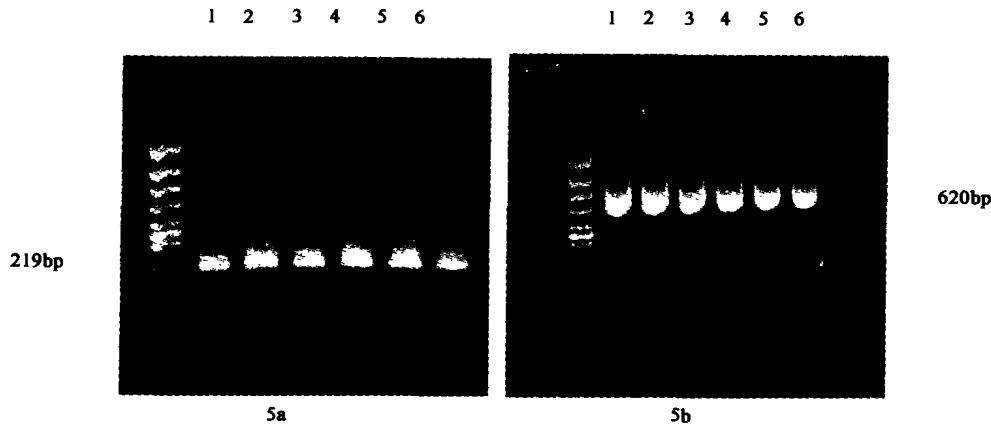


图 5 HOB 中 OPGmRNA 的表达

5a OPG 的扩增产物 5b β -actin 的扩增产物 1. 对照 2. E_2 10^{-10} M 3. E_2 10^{-8} M 4. E_2 10^{-6} M 5. ICI182780 10^{-8} M 6. ICI182780 10^{-7} M + E_2 10^{-8} M

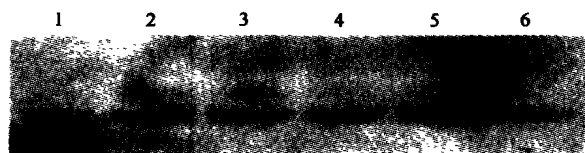


图 6 Western blot 显示 HOB 中 OPG 蛋白的表达

1. 对照 2. $17\beta-E_2$ 10^{-10} M 3. $17\beta-E_2$ 10^{-8} M 4. $17\beta-E_2$ 10^{-6} M 5. ICI182780 10^{-8} M 6. ICI182780 10^{-7} M + $17\beta-E_2$ 10^{-8} M

本研究发现 ICI182780 本身并不降低 OPG 的表达,反而可增高 OPG 蛋白质水平。ICI182780 是新研制的一种 C7 侧链修饰后的甾体类抗雌激素药物^[6],与 ER 有高亲和力,对生殖系统的靶组织受体无内在激动活性而被视为“纯”雌激素受体拮抗剂。但 ICI182780 在骨组织的作用却并不单纯,Sibonga 等^[7]发现 ICI182780 对大鼠骨的作用受血中 $17\beta-E_2$ 水平的影响,当卵巢分泌正常水平的 $17\beta-E_2$ 时,ICI182780 对松质骨的作用呈雌激素拮抗效应,而去卵巢后 $17\beta-E_2$ 水平显著降低时,ICI182780 则表现出一种弱的雌激素激动剂样作用。这与我们的实验结果有一致性,当 ICI182780 单独作用于 HOB 时,可增加 OPG 表达(激动作用),而与 $17\beta-E_2$ 合用时则降低其表达(拮抗作用)。ICI182780 的这种弱激动作用提示它对 ER 有弱的转活化作用,因此并非纯 ER 拮抗剂,而是一种选择性 ER 调节剂(SERM):在不同情况下表现为 ER 激动或拮抗双重效应。其最终显示的效应可能取决于不同的种属、不同的组织细胞、

ER 的不同亚型、受调节基因启动子上游的不同序列等因素,当然也可能是通过非受体途径发挥的作用。

我们的研究表明,酶消化法可方便地从成人骨组织中分离出较多数量、高纯度、保持体内正常功能的成骨细胞,以满足骨细胞生理研究的需要。雌激素可上调 HOB 中 OPG 的表达,可能直接经 ER 途径实现。推测绝经后雌激素不足时,OPG 水平相应降低,很可能是引起绝经后骨质疏松症骨量丢失加快的重要原因。

参 考 文 献

- 1 Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89: 309-319.
- 2 Toesca A, Pagnotta A, Specchia N. Evidence of type II estrogen receptor in human osteoblast-like cells. *Cell Biol Int*, 2000, 24: 303-309.
- 3 Sumbrook J, et al. Molecular cloning laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 345-897.
- 4 Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*, 1998, 12: 1260-1268.
- 5 Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, et al. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 250: 776-781.
- 6 Howell A, Osborne CK, Morris C, et al. ICI182780 (Faslodex™), development of a novel, “pure” antiestrogen. *Cancer*, 2000, 89: 817-825.
- 7 Sibonga JD, Dobnig H, Harden RM, et al. Effect of the high-affinity estrogen receptor ligand ICI182780 on the rat tibia. *Endocrinology*, 1998, 139: 3736-3742.