

地塞米松对成骨细胞骨保护蛋白 mRNA 的调节

张晔 吴小涛

【摘要】 目的 研究皮质醇激素对成骨细胞 OPG 基因表达的调节,探讨激素通过成骨细胞影响破骨细胞骨吸收的分子机理。方法 体外培养大鼠成骨细胞,分别给予不同时间、剂量地塞米松进行干预实验,提取总 RNA 进行半定量逆转录 PCR 分析,检测 OPG mRNA 水平的改变。结果 地塞米松可以抑制 OPG mRNA 的表达,作用强度随时间、剂量而改变。结论 激素引发的骨质疏松与其下调成骨细胞 OPG 基因表达,诱导破骨细胞形成,增加骨吸收有关。

【关键词】 骨质疏松; 糖皮质激素; 骨保护素

Regulation of osteoprotegerin mRNA levels by dexamethasone in osteoblasts ZHANG Ye, WU Xiaotao.
Department of Orthopaedics, 81th Hospital of PLA, Nanjing 210002, China

【Abstract】 Objective To study the regulation of osteoprotegerin (OPG) mRNA expression by glucocorticoid in osteoblasts and elucidate the mechanism of glucocorticoid-induced bone resorption. **Methods** Primary osteoblastic cells from calvaria of newborn SD rats were cultured, and treated with dexamethasone according to the protocol. Total cellular ribonucleic acid was isolated by the TRIzol method. Semiquantitative reverse transcriptase PCR was used to screen the level of OPG mRNA. **Results** Dexamethasone down-regulated the mRNA levels of OPG dose- and time-dependently. After 6 hours of stimulation with 50 ng/ml dexamethasone, OPG mRNA levels significantly decreased. The inhibitory effect was seen at and above 10 ng/ml of dexamethasone. **Conclusion** The inhibition of OPG expression in osteoblasts may be involved in such a mechanism of glucocorticoid-induced bone resorption and may also play a part in glucocorticoid-induced osteoporosis.

【Key words】 Osteoporosis; Glucocorticoid; Osteoprotegerin

肾上腺糖皮质激素(glucocorticoid)与骨代谢的关系非常密切,无论内源或外源性的糖皮质激素都可以导致钙和骨代谢的变化,长期使用可导致负钙和负氮平衡,使骨质生成障碍。其主要表现为骨质吸收增加。

骨的形态结构是通过不断的吸收与形成来维持的,吸收与形成的不平衡可以造成代谢性骨病,如骨质疏松。骨的形成主要由成骨细胞(osteoblast, OB)负责。成骨细胞在骨量维持中起重要作用。体外培养发现,成骨细胞不但自身合成骨基质,而且通过信号传导调控破骨细胞(osteoclast, OC)的活性。骨保护蛋白(osteoprotegerin, OPG)是成骨细胞分化过程中产生的破骨细胞抑制因子,也叫骨保护素,在破骨细胞的分化形成中起信号传导作用^[1]。由 OPG 及其配体(OPGL)严格控制着 OC 的分化,从而影响 OC 的形成和骨吸收。

激素对骨代谢的调节与 OC 有密切关系,那么其分子机理是否涉及到对成骨细胞 OPG 基因的表达调控,为此我们进行了研究,以期对激素调节骨代谢的机理进行深入探讨。

材料和方法

1. 材料: RPMI - 1640 培养液购自 Gibco 公司, I 型胶原酶购自 Sigma 公司, 50 ml 培养瓶购自 NUNC 公司。TRIzol 试剂购自 Gibco 公司, M - MLV 逆转录酶购自 Promega 公司, RNasin 购自上海华美公司, Taq 酶购自科威公司。

2. 方法

(1) 细胞培养: 按照 Ecarot 方法并加以改进^[2]。取新生 24 h SD 乳大鼠, 切取颅盖骨, 去除周围组织, PBS 漂洗后剪成 1 mm³ 大小, 加入 2 倍体积 0.25% 胰酶消化 15 min, 滤去上清, 再加入 2 倍体积 0.1% I 型胶原酶, 消化 90 min, 离心收集细胞, PBS 清洗后接种于 50 ml 培养瓶中, 加入含 10% 小牛血

清 1640 培养液,置于 5% CO₂, 37℃ 培养箱内,每 3 d 换液,一周后传代。用药前 48 h 用无小牛血清 1640 培养。地塞米松配成 1 μg/μl,按实验剂量加入,终浓度分别为 10、20、50、100 ng/ml,根据设计分别于 0、2、4、6、12 h 收集细胞。

(2)总 RNA 提取:根据 TRIzol 试剂使用说明,收集细胞,计数(2 × 10⁶/瓶),以 0.25% 胰酶消化, PBS 重悬浮,离心洗涤后至 1.5 ml 离心管中,加入 TRIzol 1 ml,混匀置室温 5 min,加入 0.2 ml 氯仿,离心,吸取上层水相至另一管中,加入 0.5 ml 异丙醇抽提, 75% 乙醇洗涤沉淀,超静台风干。产物重悬于 20 μl 无 RNase 水中, -70℃ 保存。取 5 μl 稀释 20 倍,于 Du70 紫外分光光度计下测量 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 数值,保证 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8 ~ 2.0 之间。

(3)逆转录:按照试剂盒使用方法,取 5 μl 总 RNA,加入 olig(dT)₁₈ 1 μl 及 ddH₂O 6 μl, 70℃ 作用 5 min,迅速冰浴,再加入 20 U/μl RNasin 1 μl, 10 mmol/L dNTP 2 μl, 37℃ 反应 5 min,加入 M-MLV 逆转录酶 20U, 42℃ 作用 1 h, 70℃ 反应 10 min,产物置 -20℃ 保存。

(4)PCR 扩增:50 μl 反应体系中,分别加入模板 cDNA 10 μl, OPG 特异性引物及 β-actin 引物各 1 μl、Taq 酶 2 U、MgCl₂ 3 μl、dNTP 1 μl、10 × 缓冲液 5 μl。94℃ 预变性 5 min,然后进行 PCR 扩增。反应条件:变性 94℃ 1 min;退火 55℃ 2 min;延伸 70℃ 1 min,共 30 个循环。最后一个循环 72℃ 延伸 7 min。引物

参照文献[3],由上海生工公司合成。

引物序列:OPG

上游 5'-TCC, TGG, CAC, CTA, CCT, AAT, ACA, GCA-3'。下游 5'-CTA, CAC, TCT, CGG, CAT, TCA, CTT, TGG-5'。β-actin。上游 5'-GTG, GTG, CTG, AAG, CTG, TAG, CCA, CGC, T-3'。下游 5'-GAG, CAC, CCT, GTG, CTG, CTC, ACC, CTA, GG-3'

电泳和半定量分析:称取琼脂糖,与 TBE 缓冲液配制 1.7% 凝胶,加入 1% EB 2 μl。取扩增产物 8 μl 与 2 μl 0.25% 溴酚蓝上样,与 Marker 作电泳(80 V, 25 mA)。1 h 后于紫外灯下观察,照相记录。将胶板置于 ImagerMaster VDS 图像分析仪(Pharmacia Bio-tech 公司)下扫描、分析。

3. 统计学分析:实验重复 3 次,设置 β-actin 作内参对照,防止细胞数量差异而造成误差。区带光密度比值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析, *P* 值取 0.05。

结 果

OPG 与对照基因的光密度比值结果显示,地塞米松加入成骨细胞培养体系中,可以抑制 OPG mRNA 表达(图 1)。作用 6 h 可以观察到 OPG mRNA 水平下降,差异有显著性(*P* < 0.05),且下降幅度呈剂量作用曲线改变(图 2)。100 ng/ml 时减少至 10 ng/ml 时的 40% 水平。

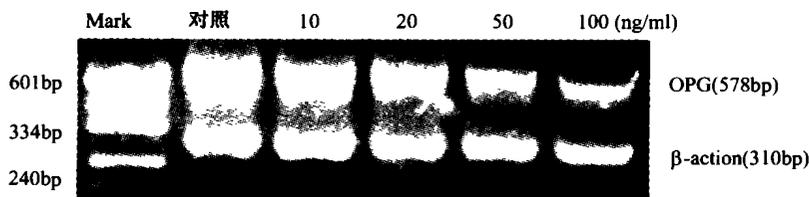


图 1 不同剂量地塞米松作用后成骨细胞 OPG 表达的电泳结果

用 20 ng/ml 的相同浓度观测则可以看到地塞米松的抑制作用也随作用时间而呈现曲线改变(图 3), 2 h 即可观察到 OPG mRNA 水平下降,抑制作用持续 12 h,为对照的 50% 水平(图 4)。

讨 论

糖皮质激素是一类在临床上广泛使用的激素,用于治疗类风湿、炎症等疾病。但长期大量使用则可以产生明显的副作用,包括骨质疏松,其发病率仅次于绝经后及老年性骨质疏松。

糖皮质激素对骨代谢的调节机理较复杂,涉及多因素。传统认为它可以促进骨组织中的蛋白质分解,抑制其合成,造成负氮平衡,引起骨质疏松。目前研究表明,激素具有加强骨吸收作用,使成骨与吸收失衡。Jowsey^[4]等用四环素双标记法观察骨切片证实破骨细胞(osteoclast, OC)数量、活性均增加,且骨吸收增强。Kaji 在此基础上发现地塞米松具有直接刺激 OC 形成的作用^[5]。因此类固醇激素在分子水平上必然对骨代谢存在作用机制。

骨的吸收主要由破骨细胞负责,1988 年,日

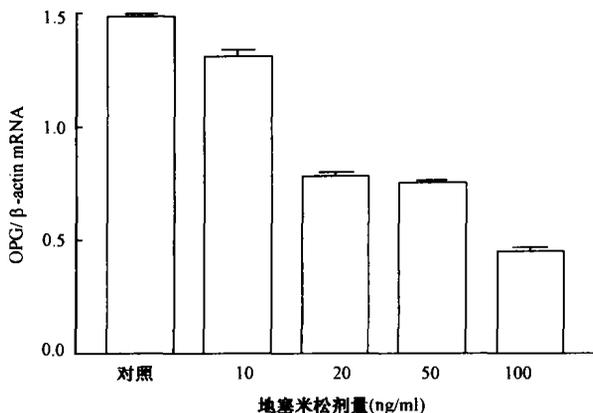
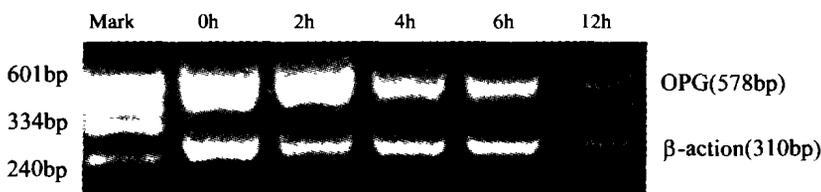


图 2 不同剂量地塞米松对成骨细胞 OPG mRNA 的作用



(20 ng/ml)

图 3 地塞米松作用后不同时间成骨细胞 OPG 表达的电泳结果

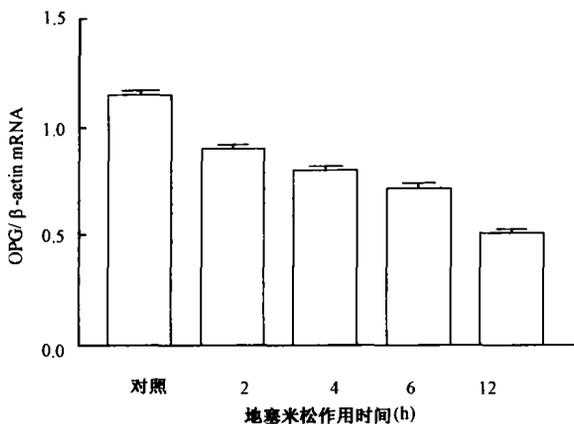


图 4 地塞米松作用后不同时间对成骨细胞 OPG mRNA 表达的影响

本学者 Takahashi^[6]建立了 OC 的体外培养方法, 从而对 OC 的认识逐渐深入, 目前认为 OC 来源于骨髓中造血干细胞的前破骨细胞, 它的分化发育信号由成骨细胞 (osteoblast, OB) 调节^[5]。1997 年, Simonet 在破骨细胞培养体系中分离出一种蛋白分子: OPG, 它由 OB 分泌, 可以抑制 OC 分化, 从而防止卵巢切除模型的骨丢失^[1]。OPG 基因敲除的老鼠则显示了明显的骨质疏松。随后又在培养体系中分离鉴定出了位于成骨细胞表面的 OPG 配体 (OPGL)^[8], 从而揭开了破骨细胞分化中的信号传导途径: 各种刺激骨吸收的因子作用于成骨/基质细胞, 诱导其细胞膜上表达 OPGL 分子, 通过与 OC 前体细胞膜上 RANK

可以诱导 OC 的骨吸收增加, 促进 OC 的形成。因此, 在两者之间必然存在着信号调控机制。在实验中我们通过与成骨细胞自身恒量表达的 β-actin 对照, 观察到地塞米松的加入可以使它的 OPG 表达水平降低, 这就预示着 OPG 分子合成减弱, 从而对 OPGL-RANK 信号轴的抑制作用减弱, 破骨细胞分化加强, 骨吸收的作用相对增强。同时, 由于 OPGL 还可以作用于成熟的 OC, 加强其活性; 正常情况下由 OPG 进行反馈调节。所以 OPG 合成的减弱, 造成反馈抑制作用下降, OC 的活性相对增强。而 Anderson 则认为 OPG 作为诱导凋亡的 TRAIL (TNF-相关的导配体 TNF-related apoptosis-induced ligand) 受体, 所具有的死亡结构域 (death domain, DD) 可以加速 OC 的凋亡^[10]。OPG 合成下降减弱了这种作用。多重因素的相结合使骨的吸收作用增强。因此地塞米松通过抑制成骨细胞 OPG 基因表达而增加骨的吸收代谢, 这可能是激素引发骨质疏松病因的一个重要原因。激素不但在蛋白水平, 而且在分子水平对骨代谢起了调节作用^[11]。

激素对成骨细胞的作用可能与它的抗炎作用一样, 是通过与核内特异性的糖皮质激素受体结合而引发。但其诱导功能基因表达改变的确切机制尚待阐明。对这些问题的进一步深入, 可以指导我们更

(下转第 282 页)

分子的直接结合, 将信号传入破骨前体细胞, 引起级联反应, 使 OC 分化成熟和激活。而 OPG 则由成骨/基质细胞旁分泌发挥作用, 竞争性与 OPGL 结合, 封闭 OPGL 与 RANK 的结合, 抑制 OC 分化、成熟。OPGL-RANK-OPG 构成了破骨细胞分化的调节信号环路^[9]。

成骨细胞是糖皮质激素作用的主要位点, 大量体内实验证明它可以抑制成骨细胞的功能, Feldman 发现其表面有皮质类固醇受体的存在, 可以直接发挥作用。骨的吸收活动由破骨细胞介导, 而激素也

网上医疗等等,必然会带动整个医学科学的进步。未来骨质疏松的研究、临床诊疗、预防保健,同样要积极引进、借鉴现代高科技,揭示疾病机理,找出新规律,解决健康与疾病的疑难问题,努力提高防治水平,节约医疗资源,降低医疗费用,为提高人民健康水平服务。

第三,充分发挥我国中西医结合优势。以古为今用,洋为中用,推陈出新的多元模式,推行将东西方医学、现代与传统医学更好的结合,发展具有中国特色的整体医学。中西医结合,中国的传统医学,在防治实践中越来越受到国内外医学界的重视和应用。今年北京宣武医院救治刘海若就是中西医结合而取得的神奇疗效,震惊海内外。在国际上有些发达国家日益重视引进、应用我国传统医学的精华。由此可见,中西医结合医学模式,是在解决健康与疾病机理的基础上,明确疾病诊断、治愈疾病的有效途径,在骨矿与骨质疏松的研究和防治工作中必须走中西医结合之路,以期获得突破性新成果。

第四,要创建适应市场体制的竞争与合作机制。我国已实行市场经济体制,就医疗服务,医药市场的需求,将呈现高质量化、层次化、多样化、个性化的趋势。我国骨质疏松医疗服务市场也日趋兴旺,前景广阔。全国近几年发展组办的骨质疏松同行学术组织也越来越多。出此可见,不论是骨质疏松医药市场和同行学会间,都面临着更加激烈的市场竞争和挑战。在新形势下,我们要在竞争中激发内在的动因,团结、凝聚、调动各种积极因素,不断完善,发展壮大自身的力量和体系,创造优势和特色。在竞争中立于不败之地,更要特别强化多方的协作,加强联合,促进跨系统、跨地区协作,多学科的交叉、渗透和融合,发扬团队精神,在竞争中创新进取,与国际接轨。希望大家齐心协力把骨质疏松和骨矿研究学术、防治工作搞得更兴旺,更有成效,造福人类健康。

预祝这次会议在大家的共同努力下取得圆满的成功。