

# 孕激素调节人成骨细胞转化生长因子- $\beta$ 1、 $\beta$ 2 的表达

罗湘杭 廖二元 苏欣 廖慧娟 伍贤平

**【摘要】 目的** 研究孕激素对正常成人成骨细胞转化生长因子(TGF)- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 表达的调节作用,探讨孕激素治疗绝经后骨质疏松症(OP)的作用机制。**方法** 鉴定成人成骨细胞(hOB),测定碱性磷酸酶(ALP)活性、骨钙素分泌, Van Gieson 氏苦味酸酸性复红染色法进行 I 型胶原染色。hOB 用孕酮干预。Northern 杂交、ELISA 分别检测 hOB TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 mRNA 和蛋白质分泌。**结果** 观察到 hOB 分泌的 ALP 活性为  $(74.3 \pm 4.7)$  mU/mg 蛋白,培养上清液骨钙素含量为  $(3.84 \pm 0.39)$  ng/ml 蛋白, I 型胶原染色呈红色。观察到孕酮增强 hOB TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 mRNA 表达呈剂量依赖性 ( $P < 0.001$ );  $10^{-9}$  mol/L 孕酮诱导 12 ~ 24 h 促进 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 mRNA 表达,呈时间依从性。孕酮促进 hOB TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 蛋白质分泌呈剂量依赖性 ( $P < 0.001$ );  $10^{-9}$  mol/L 孕酮诱导 12 ~ 24 h 促进 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 蛋白质分泌,呈时间依从性。**结论** 孕激素可能通过诱导成骨细胞 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 表达,促进成骨细胞增殖与分化,增强成骨功能及骨基质合成,促进骨形成。

**【关键词】** 孕激素; 转化生长因子- $\beta$ 1; 成骨细胞

**Progesterone upregulates TGF- $\beta$   $\beta$ 1,  $\beta$ 2 expression in normal human osteoblasts** LUO Xianghang, LIAO Eryuan, SU Xin, et al. Institute of Endocrinology & Metabolism, The Second Xiangya Hospital, Central South Medical University, Changsha 410011, China

**【Abstract】 Objective** To characterize the effects of progesterone (P) on the expression of transforming growth factors-beta (TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, and - $\beta$ 3) in normal human osteoblasts (hOB) in order to understand the mechanism by which progestin acts on bone. **Methods** Characterization of hOB by ALP activity assay, osteocalcin assay, and type I collagen staining. Northern blot analysis and ELISA were used to show the actions of P on expression of TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 mRNA and protein production in hOB cell cultures. **Results** Osteoblasts were the primary cell type found in our bone-derived cell cultures from donors. After 12 - 24 h of treatment, progesterone at  $10^{-9}$  M increased TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 mRNA levels and protein production in cultures of hOB. Treatment with increasing dose of progesterone caused a dose-dependent increase in the expression of TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 mRNA and protein by hOB. **Conclusion** A direct action of progesterone on osteoblasts may be mediated by up-regulated TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 production.

**【Key words】** Progesterone; Transforming growth factors-beta; Osteoblast

绝经是雌、孕激素同时缺乏的状态,研究表明绝经后骨质疏松症(OP)采用孕激素替代治疗可促进骨形成,减少骨丢失,其机制尚未阐明<sup>[1]</sup>。转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )是骨组织中含量最多的因子,主要由成骨细胞合成、分泌,可通过促进成骨细胞增殖与分化及骨基质合成等作用,促进骨形成<sup>[2]</sup>。作者观察了孕酮对人成骨细胞(hOB)TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 表达,以

探讨孕激素治疗绝经后 OP 的作用机制。

## 材料和方法

1. 细胞培养:正常成人成骨细胞培养方法参照 Gerhon 和 Termine<sup>[3,4]</sup>的方法进行。手术取正常成人(35 ~ 55 岁)髂前上棘松质骨并剪成 2 mm<sup>3</sup> 碎片, PBS 冲洗摇荡 3 次,加入 1 mg/ml IV 型胶原酶(Sigma 公司)37℃震摇消化,待松质骨变白并呈蜂窝状,加入含 20% 胎牛血清(FBS, Gibico 公司)的无酚红的 MEM(Sigma 公司)终止消化,含 10% FBS 的 MEM 洗

涂3次,待洗液中不含细胞时,将骨片贴于25 cm<sup>2</sup>培养瓶壁,加含15%FBS的MEM,其中含10%,青霉素50 U/ml,庆大霉素50 μg/ml,37℃,5%CO<sub>2</sub>培养。2 d后换液,以后每3 d换液1次,培养约15 d后,可见有细胞游出,约25 d后达汇片,用0.25%胰酶-EDTA(Sigma公司)消化液消化,再接种25 cm<sup>2</sup>培养瓶,细胞数为5×10<sup>5</sup>个/瓶。

2. 培养细胞的鉴定:采用α-磷酸奈酚法及全自动生化分析仪(日立7000型)测定细胞内的碱性磷酸酶(ALP)活性。将培养细胞用PBS冲洗2次。Tris-HCl加超声粉碎裂解细胞,离心后取上清液测定ALP活性,用骨钙素放射免疫法测定试剂盒(DiaSorin公司)测定培养上清液中骨钙素含量,灵敏度为0.2 ng/ml。用Bradford方法测出细胞内总蛋白含量,校正ALP及骨钙素。

采用Van Gieson氏苦味酸酸性复红染色法进行I型胶原染色。取在上述培养液培养的第12天hOB, PBS洗3次,丙酮固定5 min, Van Gieson氏苦味酸酸性复红染色液染色5 min,浸入95%酒精2 min,取出于倒置显微镜下观察并拍照。

3. 细胞干预试验:hOB培养于25 cm<sup>2</sup>培养瓶中,在含10%FBS的上述培养液中培养2 d,换1%FBS培养液培养4 d,含0.25%牛血清白蛋白(BSA, Sigma公司)的无血清MEM培养2 d,用0(含0.25%BSA的无血清MEM)、10<sup>-10</sup>、10<sup>-9</sup>、10<sup>-8</sup> mol/L(孕酮Sigma公司)干预24 h,或用10<sup>-9</sup> mol/L孕酮干预4, 12, 24 h。抽提细胞总RNA,行Northern杂交,收集培养液行酶联免疫吸附测定(ELISA)。

4. Northern杂交:参照分子克隆实验指南进行操作<sup>[5]</sup>, Trizol(Gibicol公司)抽提细胞总RNA。TGF-β1、TGF-β2 cDNA探针用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)合成<sup>[6]</sup>。在Gene Amp 2400 PCR扩增仪上(Perkin Elmer公司)进行。首先取1.0 μg总RNA,用逆转录试剂盒(Promega公司)合成cDNA,再取cDNA行PCR扩增TGF-β1、TGF-β2基因。引物序列及扩增条件参照文献<sup>[7]</sup>。扩增产物纯化后直接测序证实cDNA序列。

取20 μg总RNA, 1%甲醛变性胶电泳,真空转膜2 h。随机引物法[α-<sup>32</sup>P]-dATP标记TGF-β1、TGF-β2和G3PDH探针。转印RNA的尼龙膜68℃预杂交1 h,再加[α-<sup>32</sup>P]-dATP标记TGF-β1或TGF-β2探针68℃杂交过夜,洗膜,放射自显影72 h,洗片显带。同样的尼龙膜洗脱探针,再与[α-<sup>32</sup>P]-dATP标记G3PDH探针杂交4 h,放射自显影48 h,洗片显带。

G3PDH为内对照。条带行光密度扫描,以G3PDH校正作相对量分析,mRNA表达丰度值以TGF-β1或TGF-β2/G3PDH光密度比值百分率(%)表示。实验均重复3次。

5. ELISA:TGF-β1、TGF-β2检测 ELISA试剂盒(深圳晶美公司)检测细胞培养液中TGF-β1、TGF-β2总含量。每组样本数为6。

6. 统计方法:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析。

## 结 果

1. hOB鉴定:hOB分泌的ALP活性为(74.3 ± 4.7) mU/mg蛋白。hOB的培养上清液中可测出骨钙素,为(3.84 ± 0.39) ng/ml蛋白。Van Gieson氏苦味酸酸性复红染色(图1)显示,hOB接种培养12 d后,镜下见细胞I型胶原染色呈红色。这表明分离培养的hOB具有成骨细胞的特性。

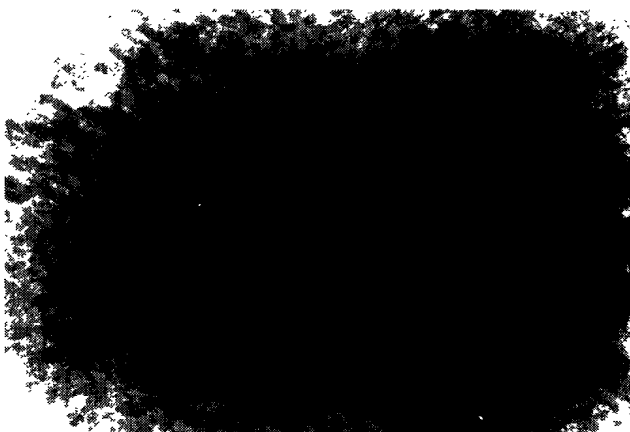


图1 Van Gieson氏苦味酸酸性复红染色法染色hOB I型胶原

2. Northern杂交分析孕酮对hOB TGF-β1、TGF-β2 mRNA表达的影响:Northern杂交结果显示(图2), hOB对照组及10<sup>-10</sup> mol/L孕酮干预组TGF-β1 mRNA表达条带极弱,几乎不可见,mRNA表达丰度值分别为(6.0 ± 0.6)%、(9.3 ± 0.9)%;10<sup>-9</sup>、10<sup>-8</sup> mol/L孕酮干预组TGF-β1 mRNA表达条带明显逐渐增强,分别为(27.0 ± 2.7)%、(57.7 ± 5.0)%, *P*均<0.001。hOB对照组及10<sup>-10</sup> mol/L孕酮干预组TGF-β2 mRNA表达条带极弱,几乎不可见,mRNA表达丰度值分别为(5.0 ± 0.6)%、(9.0 ± 0.5)%;10<sup>-9</sup>、10<sup>-8</sup> mol/L孕酮干预组TGF-β2 mRNA表达条带明显逐渐增强,分

别为 $(23.0 \pm 1.5)\%$ 、 $(52.7 \pm 3.0)\%$ ,  $P$  均  $< 0.001$ 。这表明, 孕酮诱导 hOB TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 mRNA 表达, 并呈剂量依赖性。

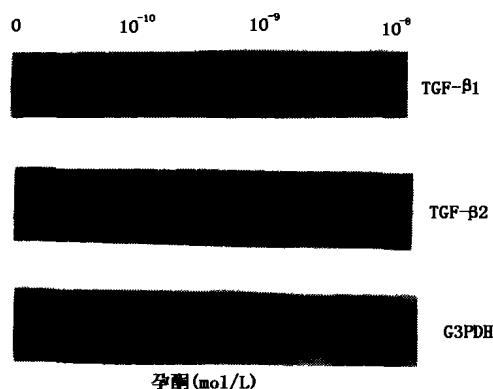


图2 Northern 杂交分析  $10^{-10} \sim 10^{-8}$  mol/L 孕酮对 hOB TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 mRNA 表达的影响

图3显示,  $10^{-9}$  mol/L 孕酮干预 12 h 及 24 h, TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达明显增强, 分别为对照组的 $(2.4 \pm 0.2)$ 倍、 $(4.8 \pm 0.6)$ 倍。 $10^{-9}$  mol/L 孕酮干预 12 h 及 24 h, TGF- $\beta$ 2 mRNA 表达明显增强, 分别为对照组的 $(2.1 \pm 0.7)$ 倍、 $(5.1 \pm 0.8)$ 倍。这表明孕酮诱导 hOB TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 mRNA 表达并呈时限性。

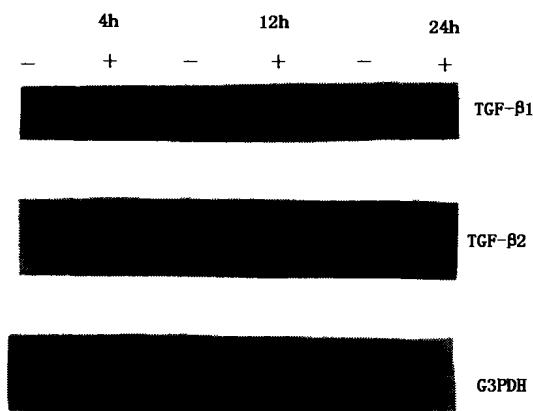
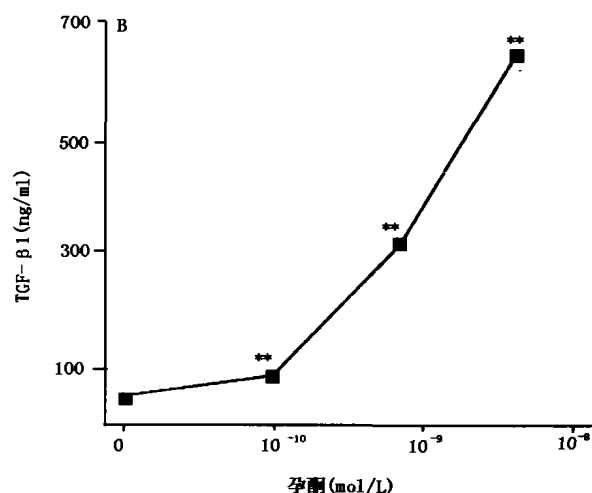
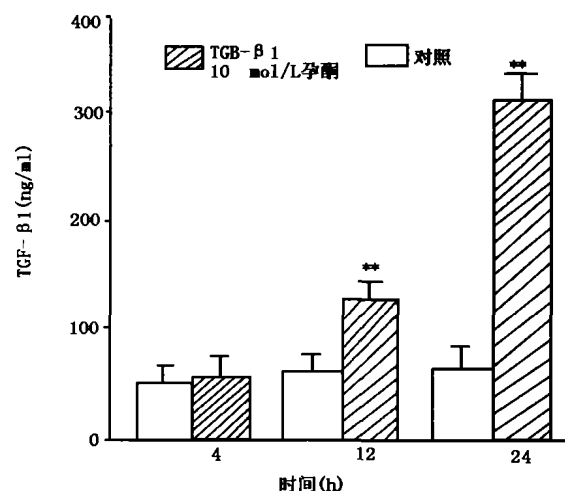


图3 Northern 杂交分析不同时间点  $10^{-9}$  mol/L 孕酮对 hOB TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 mRNA 表达的影响

2. ELISA 分析孕酮对 hOB TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 分泌的影响: 图4A显示孕酮诱导 hOB TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 分泌呈时限性; 图4B显示孕酮诱导 hOB TGF- $\beta$ 1 分泌呈剂量依赖性。图5A显示孕酮诱导 hOB TGF- $\beta$ 2 分泌呈时限性; 图5B显示孕酮诱导 hOB TGF- $\beta$ 2 分泌呈剂量依赖性。

## 讨论

骨组织中含有丰富的 TGF- $\beta$ , 主要由成骨细胞合成、分泌<sup>[2]</sup>。研究认为成骨细胞表达的 TGF- $\beta$  在骨重建过程中起促进骨形成的关键作用<sup>[2]</sup>。体外实验研究表明 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 可刺激成骨细胞增殖, 促进骨基质合成, 如 I 型胶原、骨连接素 (osteonectin)、纤维连接素 (fibronectin) 等<sup>[2]</sup>。Kassem 等<sup>[8]</sup>发现 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 不仅可促进成骨细胞增殖, 亦可诱导成骨细胞分化成熟。体内实验研究表明 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 可通过促进成骨细胞增殖及骨基质合成的作用, 促进骨形成<sup>[9]</sup>。在大鼠和兔的颅骨骨膜下注射 TGF- $\beta$ , 可诱导新骨形成。这表明成骨细胞表达的 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 是骨形成的重要刺激因子。



注: 与对照组比较, \*\*  $P < 0.001$ ; 下图同

图4 孕酮对 hOB TGF- $\beta$ 1 蛋白质分泌的影响

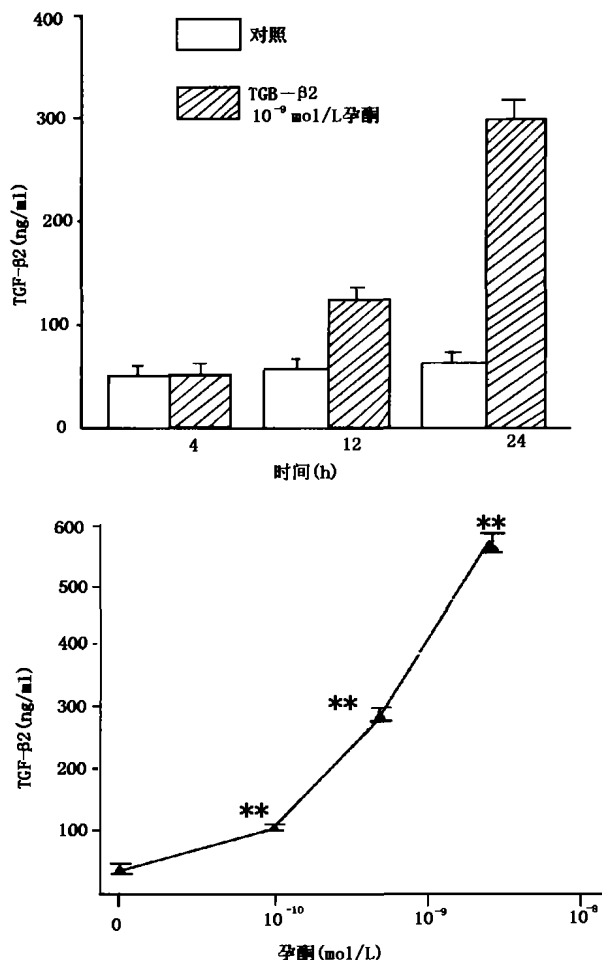


图5 孕酮对 hOB TGF-β2 蛋白质分泌的影响

孕激素可通过促进成骨细胞增殖与分化、增强成骨细胞活性及骨基质合成,促进骨形成,但其机理不明。本实验观察了孕酮对人成骨细胞(hOB) TGF-β1、TGF-β2 表达的作用。

本实验结果表明,孕酮诱导 hOB TGF-β1、TGF-β2 mRNA 表达和蛋白质分泌,并呈剂量依赖性及时限性。孕酮诱导 hOB TGF-β1、TGF-β2 mRNA 表达和蛋

白质分泌有其重要意义。孕酮刺激 hOB TGF-β1、TGF-β2 mRNA 表达和蛋白质分泌表明,TGF-β1、TGF-β2 可能是孕激素促进骨形成的重要中介因子。孕激素诱导成骨细胞 TGF-β1、TGF-β2 表达,促进成骨细胞增殖与分化、增强成骨功能及骨基质合成,促进骨形成。绝经后予孕激素治疗可通过诱导成骨细胞 TGF-β1、TGF-β2 表达,促进骨形成,减少骨丢失。

### 参 考 文 献

- 1 Gunnet JW, Granger K, Cryan E, et al. Characterization of the progesterone receptors in the human TE85 and murine MC3T3-E1 osteoblast-like cell lines. *J Endocrinology*, 1999, 163: 139-147.
- 2 Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, et al. Transforming growth factor-β gene family members and bone. *Endocr Rev*, 1994, 15: 27-39.
- 3 Gerhron RP, Termine JD. Human bone cells *in vitro*. *Calcif Tissue Int*, 1985, 37: 453-460.
- 4 Eryuan Liao, Xianghang Luo. Effects of 17β-estradiol on the expression of matrix metalloproteinase-1, -2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human osteoblast-like cell cultures. *Endocrinology*, 2001, 15: 291-295.
- 5 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TM. *Molecular cloning laboratory manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 888-897.
- 6 Xianghang Luo, Eryuan Liao. Progesterone differentially regulates the membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) compartment of proMMP-2 activation in MG-63 cells. *Horm Metab Res*, 2001, 33: 383-388.
- 7 Wu Y, Kumar R. Parathyroid hormone regulates transforming growth factor beta 1 and beta 2 synthesis in osteoblasts via divergent signaling pathways. *J Bone Miner Res*, 2000, 15: 879-884.
- 8 Kassem M, Kveiborg M, Eriksen EF. Production and action of transforming growth factor-beta in human osteoblast cultures: dependence on cell differentiation and modulation by calcitriol. *Eur J Clin Invest*, 2000, 30: 429-437.
- 9 Beck LS, Amento EP, Xu Y, et al. TGF-beta 1 induces bone closure of skull defects: temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rhTGF-beta 1. *J Bone Miner Res*, 1993, 8: 753-761.

(收稿日期: 2002-06-25)