

# Cbfa1 基因与成骨细胞标志物在 HOS TE85 中的表达

陈亚琼 熊小云 胡玉珍 吴曙光

**【摘要】 目的** 观察核心编码因子(cbfa1)基因在人的类成骨细胞株 TE85 的表达与骨钙素、I 型胶原和碱性磷酸酶合成及分泌的关系。**方法** 原位杂交组织化学技术、放射免疫法、硝基苯酚法和<sup>3</sup>H 脯氨酸掺入法。**结果** (1)细胞培养至第 3 天可见 cbfa1 基因表达,第 9 天达高峰,12 d 时表达减弱;(2)骨钙素和 I 型胶原的表达在第 12 天时达峰值,碱性磷酸酶在第 15 天时达峰值。**结论** cbfa1 基因表达与成骨细胞标志物表达之间的时差关系,提示 cbfa1 基因在成骨细胞增殖和分化中有重要作用。

**【关键词】** 成骨细胞; 核心编码因子; 原位杂交

**Expression of core binding factor alpha 1 gene and osteoblast markers in human osteoblast-like TE 85 osteosarcoma cell line** CHEN Yaqiong, XIONG Xiaoyun, HU Yuzhen, et al. Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the relationship between the expression of core binding factor alpha 1(Cbfa1)and synthesized and secreted osteoblast marker including type 1 collagen, osteocalcin and alkaline phosphatase in human osteoblast-like TE85(HOS TE85)osteosarcoma cell line.**Methods** *In situ* hybridization histochemical techniques, radioimmunoassay, nitrophenol assay and the incorporation and hydroxylation of [<sup>3</sup>H] Proline.**Results** (1)The expression of cbfa1 gene began to be found find in on the third day of cell culture and peaked in the ninth day, and weakened on the twelfth day. (2)Values of type 1 collagen synthesized and osteocalcin secreted in HOS TE85 cell line peaked on the twelfth day, and that of alkaline phyosphatase on the fifteenth day.**Conclusion** Cbfa1 gene may have regulatory roles in synthesizing and secreting osteoblast markers including type 1 collagen, osteocalcin and alkaline phosphatase in human osteoblast-like TE85 cell line.

**【Key words】** Osteoblast; Core binding factor; *In situ* hybridization

核心编码因子(core binding factor alfa, Cbfa1)属于 runt 结构域基因家族的转录因子,不但是骨形成的重要转录因子,而且在成骨细胞表达的主要功能基因中起关键的调节作用。研究表明,在骨钙素基因的启动子中包含有能与 cbfa1 结合的序列→成骨细胞特异性顺势作用元件。已经发现特异性顺势作用元件存在于成骨细胞表达的所有主要基因之中,如骨钙素基因,骨唾液酸蛋白基因,骨桥素基因及 I 型胶原基因等。Cbfa1 通过与特异性顺势作用元件结合,参与了成骨细胞募集、增殖和分化等过程。我们选择了人的类成骨细胞株 TE85 作为体外实验模型,观察成骨细胞cbfa1基因表达及其标志物碱性磷

酸酶(ALP)、I 型胶原和骨钙素分泌情况,为建立体外药物筛选模型提供实验依据。

## 材料和方法

### 1. 细胞来源与主要试剂

人的类成骨肉瘤细胞株 TE85(HOS TE85)由美国旧金山大学细胞库提供,胎牛血清(FCS)为 Gibico 公司产品。去固醇血清(Charcoal-Stripped fetal calf serum, CS-FCS)自备,制备方法:取活性炭置刻度离心管中 180℃干烤 1 h,然后加入 FCS,使活性炭终浓度为 4%~5%(V/V),充分混匀放置 1 h 后离心,吸取上清液即为去固醇血清。

### 2. 细胞培养与处理

冻存细胞经复苏后,以 10% 胎牛血清加 McCoy' 5A 培养基构成培养液,将细胞接种于 100 ml 玻璃培养瓶中,在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养,孵育 24 h

后更换液体,以后每 2~3 d 更换 1 次培养液,一般 4~6 d 长满。以  $3 \times 10^4$  细胞接种于 6 孔培养板中或在玻片上,培养 24 h 后,更换含 7.5% 去固醇血清培养液,当细胞培养至 3, 6, 9, 12, 15, 18 d 时,分别收集培养液,用放射免疫法测定骨钙素含量,以  $\gamma$  闪烁计数器测定放射性活度,单位以 ng/ml 表示。载玻片上细胞用 PBS 洗涤细胞 3 次,细胞刮擦器取下细胞,以超声破膜,10 S  $\times$  3 次,离心 (15 000  $\times$  g/30 min, 4 $^{\circ}$ C),取上清采用对硝基苯酚法测定碱性磷酸酶活性,活性单位以 IU/mg 蛋白表示。用  $^3$ H 脯氨酸掺入试验测定 I 型胶原合成量,细胞培养方法以及培养时间同上。细胞蛋白质含量用考马斯蓝测定并校正。

### 3. Cbfa1 基因检测-原位杂交

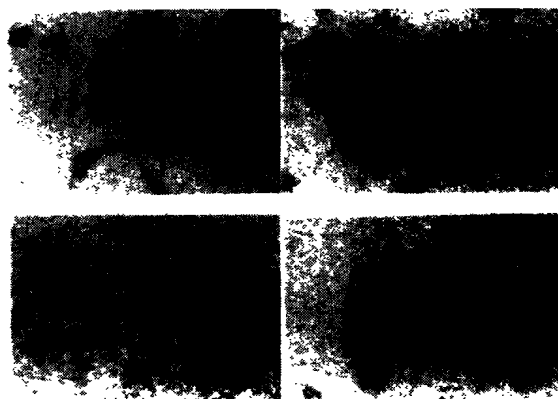
Cbfa1 寡核苷酸探针由上海 Sangon 公司合成,其序列为:5'-ACGACA ACCGCA CCATGGT-3',采用 3'末端标记法和 [ $\alpha$ - $^{35}$ S]dATP (> 1 000Ci/mmol, Amersham) 对寡核苷酸探针进行标记。标记探针的特异性放射性为  $(1.0 \sim 1.4) \times 10^9$  dpm/ $\mu$ g。将接种于载玻片上的细胞培养至 3, 6, 9, 12 d 后,经磷酸盐缓冲液清洗 3 次,快速干燥,用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液及杂交前处理液 (0.9% 氯化钠, 1.5% 三乙醇胺和 0.25% 乙酸酐) 处理,经系列酒精脱水和氯仿脱脂后做原位杂交。将 200  $\mu$ l 杂交液 [4  $\times$  SSC, 50% 甲酸胺、0.025% tRNA、10% 硫酸蔗糖、1  $\times$  Denhardt's 液 (含 0.02% 牛血清白蛋白、0.02% Ficol400、0.02% PVP K-30)], 15  $\mu$ l DTT 及标记探针 [(6~9)  $\times 10^6$  dpm/载玻片] 滴于细胞爬片表面,置湿盒中 40 $^{\circ}$ C 孵育 48 h。杂交后,用 1  $\times$  SSC 冲洗 (55 $^{\circ}$ C, 3  $\times$  20 min),最后将 LM-1 型乳胶 (Amersham) 涂于细胞爬片表面,暗盒中曝光 (4 $^{\circ}$ C)。4 周后,用 Kodak D-19 显影液显影, F-5 显影液定影。1% 硫堇复染。脱水、透明、封片,在光镜下明、暗视野观察并摄片,每组细胞取 3 张爬片进行 Cbfa1 mRNA 阳性细胞的计数。

4. 统计学处理:差异显著性检测用  $t$  检验。

## 结 果

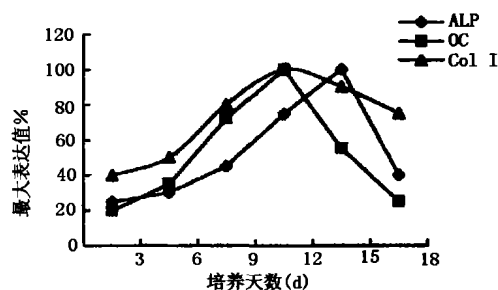
### 1. Cbfa1 基因表达

原位杂交发现,细胞培养至第 3 天,已经可见到有 cbfa1 基因表达的阳性细胞,第 9 天时达高峰,12 d 时表达减弱,见图 1。培养液中的 OC 分泌量第 9 天开始增加,第 12 天时分泌量达峰值,第 18 天时降至增殖期水平,结果见图 2。



有黑色颗粒的为阳性表达细胞。A:3d B:6d C:9d D:12d

图 1 培养不同时间的 TE85 细胞 cbfa1 mRNA 的表达 (40  $\times$  3  $\times$  3)



ALP:碱性磷酸酶 OC:骨钙素 Col I: I 型胶原

图 2 人的类成骨细胞株 TE85 成骨细胞标志物的变化规律

### 2. 成骨细胞标志物的表达:

细胞培养液中骨钙素含量和细胞中 I 型胶原合成量在细胞培养至第 3~9 天时迅速增加的 12 d 达最高峰,以后逐渐下降;培养液中碱性磷酸酶的释放在 6~12 d 增加明显,第 15 天达高峰后逐渐降低。

## 讨 论

### 1. Cbfa1 基因表达与成骨细胞分化标志物的关系

成骨细胞又称为骨形成细胞,由具备多向分化潜能的间充质细胞、前成骨细胞分化而来,一旦完成终末分化,分泌产生各种细胞外基质蛋白,并控制骨基质的矿化过程。近年来研究发现,核心编码因子 (core binding factor alpha) 决定着成骨细胞的发生与分化,是骨形成的关键基因。Cbfa1 属于 runt/cbfa1 转录因子家庭成员,因作为核蛋白结合到成骨细胞基因上的特异性顺式激活元件,激活成骨细胞特异性基因——骨钙素基因的表达而被鉴定。Cbfa1 能稳定地调节成骨细胞所有主要基因的表达。Cbfa1 除对成骨细胞的发育和分化有作用之外,还对骨基质

的沉积率有调节作用<sup>[1-3]</sup>。

## 2. cbfal 基因对成骨细胞中其他主要基因的调节

cbfal 不但对成骨细胞的分化,而且对成骨细胞的功能是一个关键基因。组织学显示,cbfal 基因缺乏时骨组织没有成骨细胞和骨基质的形成。在分子水平上没有骨细胞外基质标志物如骨桥素、骨唾液酸蛋白和骨钙素的表达,但有 I 型胶原和 ALP 等成骨细胞早期标志物的表达。这些差别提示 cbfal 的控制基因表达与分化阶段密切相关,对于分化早期标志物,由于对成骨细胞类型的特异性较差,故没有太大影响。同时也提示,cbfal 对这些基因表达的调节不像骨钙素、骨桥素和骨唾液酸蛋白那样重要。所有 cbfal 基因缺乏的组织学和分子水平的证据提示 cbfal 对于成骨细胞分化即骨生成是必须的。由于骨钙素、骨桥素、骨唾液酸蛋白 3 种基因表达在 cbfal 基因突变小鼠中被阻断,所以,cbfal 对这 3 种基因有直接调节作用<sup>[4-7]</sup>。

## 3. Cbfal 表达的调节过程可成为骨形成新药的目的靶

细胞分化并不是最后目的,成骨细胞进行分化之后,必须完成它们的功能,细胞外基质沉积和逐渐矿化。cbfal 的生物学特征提示它的功能不仅限于发育和分化。首先,cbfal 在出生后及整个成骨细胞分化阶段都保持着表达;其次,Cbfal 是骨钙素的主要调节因子,骨钙素基因在胚胎发育处于静止状态,而在成熟的成骨细胞是非常特异的表型。这两个特点使 cbfal 能在决定这些细胞的命运及保持它们的功能方面起作用。转基因研究发现,在 I 型胶原蛋白,骨桥素、BSP 和骨钙素基因的启动子区域 cbfal 能与之结合的位点,直接调节这些基因的表达。由于对“调节基因”认识的提高,近 20 年来强调这样一种概念,一个转录因子的表达常常是它的靶基因被激活过程中众多步骤中的一步。转录因子可能必须经转

录后修饰成为活性形式,或者转入核中,或需与一个伴侣分子结合后再与 DNA 结合,继而激活转录过程,这两种过程可以单独存在,也可兼而有之,对 cbfal 而言,还没有研究涉及到这些可能的机制。总之,这些涉及到 cbfal 表达和调节的多个环节,可能成为骨形成新药研究的作用靶点<sup>[8-10]</sup>。

## 参 考 文 献

- 1 DUCY P. Cbfal: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn*, 2000, 219: 461-471.
- 2 Hoshi K, Komori T, Ozawa H. Morphological characterization of skeletal cells in Cbfal-deficient mice. *Bone*, 1999, 25: 639-651.
- 3 Schinke T, Karsenty G. Characterization of Osfl, an osteoblast-specific transcription factor binding to a critical cis-acting element in the mouse osteocalcin promoters. *J Biol Chem*, 1999, 274: 30182-30189.
- 4 Prince M, Banerjee C, Javed A, et al. Expression and regulation of Runx2/Cbfal and osteoblast phenotypic markers during the growth and differentiation of human osteoblasts. *J Cell Biochem*, 2001, 80: 424-440.
- 5 Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, et al. Cbfal isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem*, 1999, 274: 6972-6978.
- 6 Siggelkow H, Schenck M, Rohde M, et al. Prolonged culture of HOS 58 human osteosarcoma cells with 1, 25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, TGF-beta, and dexamethasone reveals physiological regulation of alkaline phosphatase, dissociated osteocalcin gene expression, and protein synthesis and lack of mineralization. *J Cell Biochem*, 2002, 85: 279-294.
- 7 Zaidi SK, Javed A, Choi JY, et al. A specific targeting signal directs Runx2/Cbfal to subnuclear domains and contributes to transactivation of the osteocalcin gene. *J Cell Sci*, 2001, 114: 3093-3102.
- 8 Ziros PG, Gil AP, Georgakopoulos T, et al. The bone-specific transcriptional regulator Cbfal is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 2002, 277: 23937-23941.
- 9 Crombrughe B, Lefebvre V, Nakashima K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13: 721-727.
- 10 DUCY P. Cbfal: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn*, 2000, 219: 461-471.

(收稿日期: 2002-11-06)

## 重要会议消息

第四届国际骨质疏松研讨会暨第二届国际骨矿会议(秋季会议)在 2003 年 11 月 3~8 日在桂林召开,征文截稿日期:2003 年 8 月 25 日

请查阅网站: [www.china-osteofound.org](http://www.china-osteofound.org)