

rhIGF-1 对成骨细胞增殖、分化及骨保护素、骨保护素配体基因 mRNA 表达的影响

石义刚 陶天遵 陶树清 刘枫晨 徐强 王立春 吉光荣 吴丽萍

【摘要】 目的 观察不同剂量 rhIGF-1 对成骨细胞增殖、分化及骨保护素、骨保护素配体 mRNA 基因表达的影响,为明确骨保护素、骨保护素配体在骨质疏松症发病的作用机理及 rhIGF-1 在临床中的应用提供实验依据。方法 取 2 代培养的大鼠成骨细胞,在 rhIGF-1 为 0 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml 的浓度中培养。观察细胞的生长及钙结节的形成,MTT 法、碱性磷酸酶 (ALP)、骨钙素 (OCN) 测定细胞增殖和分化,RT-PCR 测定 rhIGF-1 对成骨细胞骨保护素、骨保护素配体基因 mRNA 表达的影响。结果 成骨细胞在 7 d 可铺满瓶壁,30 d 可形成钙结节, rhIGF-1 可促进成骨细胞的增殖、ALP 和 OCN 的分泌,促进骨保护素、骨保护素配体基因的表达,以促进骨保护素表达明显,在 rhIGF-1 为 10 ng/ml 时作用明显。结论 rhIGF-1 可促进大鼠成骨细胞的增殖、分化,及骨保护素、骨保护素配体基因 mRNA 的表达,骨保护素 mRNA 表达显著。rhIGF-1 可能通过影响骨保护素、骨保护素配体而调节成骨细胞、破骨细胞的平衡,使骨重建,从而防治骨质疏松症。

【关键词】 成骨细胞; rhIGF-1; 增殖; 分化; 骨保护素; 骨保护配体

Effect of rhIGF-1 on the proliferation and differentiation and OPG, RANKL gene expression in rat osteoblast SHI Yigang, TAO Tianzun, TAO Shuqing, et al. The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China

【Abstract】 Objective To assess the effect of rhIGF-1 on the proliferation and differentiation and OPG, RANKL gene expression in rat osteoblast, investigate the mechanism of OPG, RANKL in osteoporosis. **Methods** The second generation of rats osteoblast were cultured in medium with different concentrations of rhIGF-1. Cell proliferation was detected by optical microscope and MTT method, differentiation was determined by measuring alkaline phosphatase (ALP) activity and osteocalcin secretion. OPG and RANKL gene expression were quantified by RT-PCR. **Results** rhIGF-1 in low dose ($P < 0.05$) obviously increased osteoblast proliferation and differentiation and the gene expression of OPG and RANKL, especially in the gene expression of OPG ($P < 0.05$). **Conclusion** rhIGF-1 stimulated osteoblast proliferation and differentiation especially in low dose, so as in the gene expression of OPG and RANKL. It increased more the gene expression of OPG than that of RANKL. rhIGF-1 regulated the balance between osteoblast and osteoclast by affecting the gene expression of OPG and RANKL, it is possibly the protecting and treatment mechanism of osteoporosis.

【Key words】 Osteoblast; rhIGF-1; Proliferation; Differentiation; OPG; RANKL

成骨细胞 (Osteoblast OB) 是调节破骨细胞 (Osteoclast OC) 功能与分化的,最近发现了其调节的新的分子学机理。破骨细胞的分化依赖于成骨/基质细胞,最近在研究破骨细胞的过程中发现了一种由

成骨/基质细胞产生的因子—骨保护素 (Osteoprotegerin OPG) 及骨保护素配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand RANKL), OPG 属于肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor TNF) 受体超家族成员, RANKL 是 OPG 的配体。在过去发现的调节成骨细胞、破骨细胞的众多因子如甲状旁腺素 (PTH)、维生素 D、白介素、肾上腺皮质激素^[1] 等被认为都是通过直接作用于成骨细胞而调节 OPG 和 RANKL 这两个因子之间的浓度的增加与减少进而完成调节功能的。OPG

作者单位: 150086 哈尔滨医科大学附属第二医院 (石义刚、陶天遵、陶树清、刘枫晨、王立春、吉光荣、吴丽萍); 黑龙江中医药大学 (徐强)

是一种分泌性糖蛋白^[2],它由许多组织产生。OPG 在生理条件下具有抑制骨吸收的活动。OPG 也能抑制高钙血症和由 IL-1 α 、TNF- α 、PTH、PTHrP、1, 25 (OH)₂D₃ 和切除卵巢引起的骨丢失^[3]。OPG 抑制绝经后妇女的骨吸收活动具有显著的作用。因此,研究细胞因子与 OPG 和 RANKL 的作用关系,可为骨质疏松的防治提供理论基础和方法。

材料和方法

1. 大鼠成骨细胞体外分离与培养^[4]

将新生 24 h 内 Wistar 大鼠无菌条件下取颅盖骨,剪碎至体积小于 1 mm × 1 mm × 1 mm,用 Hank's 液充分冲洗。采用分离细胞培养法,Ⅱ型胶原酶(sigma 公司)中于 37℃消化 2 次。消化弃上清,沉淀加入培养液 DMEM(GIBCO)混合液加 15% 新生牛血清(GIBCO)后,调整细胞计数后浓度为 1.0×10^5 移入 50 ml 培养瓶中在 5% CO₂、37℃饱和湿度条件下的恒温箱中孵化,培养液每 3 天更换 1 次。当细胞长满瓶底后,用 0.25% 的胰蛋白酶 0.02% EDTA 消化,按 1.0×10^5 做传代至 25 ml 培养瓶中培养进行实验。因子处理前 2 d 用只含 0.1% 牛血清白蛋白(BSA)的 DMEM 培养基培养细胞 48 h。

2. 大鼠成骨细胞的特征性鉴定原代及二代培养的成骨细胞作鉴定

(1)一般形态学观察:采用倒置相差显微镜每日观察细胞的生长情况及形态特征,并照相。

(2)碱性磷酸酶(ALP)染色(改良 Gomori 氏钙-钴法)^[5]

阳性细胞计数法:随机抽出两张片,每张片随机计数 200 个细胞,测出 ALP 阳性细胞的百分率。

3. 成骨细胞上清液 ALP 检测

分别取加入重组胰岛素样生长因子(rhIGF-1 Peptech)前后的成骨细胞各 8 瓶上清液,采用磷酸对硝基苯酯二钠盐比色法,日立 7000 全自动生化分析仪测定细胞上清液碱性磷酸酶的活性。

4. 成骨细胞上清液骨钙素(OCN)检测

分别取加因子前后的成骨细胞各 8 瓶上清液,采用北免东雅骨钙素放免试剂盒。根据放射免疫试剂盒说明书测定培养细胞上清中骨钙素(OCN)的含量, γ 计数器测定沉淀物每分钟计数,根据标准品曲线得到样品 OCN 含量。

5. 噻唑蓝(MTT)法测生长曲线

将对数生长期的细胞制成 1×10^4 细胞悬液接种于 96 孔板,每孔滴加 1×10^4 的细胞悬液 200 μ l,

0 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml 终浓度的 rhIGF-1 每组设 3 个孔,将培养板置于 CO₂ 孵育箱中,分别于接种后第 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 天取出,每孔加 5 μ g/L 的 MTT 20 μ l 继续培养 4 h,弃上清液,每孔加入 150 μ l 二甲基亚砷(DMSO)振荡溶解沉淀,用酶联免疫检测仪在 492 nm 波长下读取每孔的吸光度并绘制生长曲线。

6. 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

细胞培养及处理同前。

(1)总 RNA 提取及检测:采用 Trizol 试剂盒(Gibco 公司)提取成骨细胞总 RNA,取少量做快速琼脂糖电泳,以分析 RNA 的完整性。

(2)cDNA 第一链合成:采用 Superscript II (Gibco 公司)第一链合成试剂盒,操作按产品说明书进行。

(3)多聚酶链反应(PCR)及其产物分析:目的基因为 OPG、RANKL,内照基因为 β -actin。引物由上海生工合成,OPG 上游引物:5'-tgccggatgggtctctcaggt-3',下游引物:5'-ttcccaggcaagctctccatcaag-3',扩增长度为 482 bp,OPGL 上游引物:5'-ttcgaggttctcagtgccacag-3',下游引物:5'-ggctggtgaggaaattagctc-3',扩增长度为 453 bp, β -actin 上游引物:5'-gtttgagaccttcaacacccc-3',下游引物:5'-gtggccatctctctgtctcgaagtc-3',扩增长度为 320 bp。反应体系为 50 μ l,双蒸水 33.5 μ l, dNTP 1 μ l, MgCl₂ 3 μ l, 10 × Buffer 5 μ l, Taq 酶 0.5 μ l, 上游引物各 1 μ l, 下游引物各 1 μ l, 模板 3 μ l。OPG 反应条件:94℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 59℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s 共 30 个循环,最后延伸 7 min。OPGL 反应条件:94℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 53℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s 共 30 个循环,最后延伸 7 min。

(4)PCR 产物分析:取 PCR 产物 5 μ l 和 DL2000Marker(宝生物公司),在 1.5% 琼脂糖下电泳,于紫外线箱中观察并记录。通过 GDS8000DNA 定量测定系统对目的基因和参照基因条带进行像素值测定,并计算出二者的比值。

7. 统计分析:实验结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用方差分析,两两比较应用 t 检验。

结 果

1. 成骨细胞贴壁后的形态及钙-钴染色:成骨细胞培养第 2 天开始贴壁,第 7 天铺满瓶壁。传代后细胞贴壁较快,约 12 h 贴壁,4 d 铺满瓶壁。细胞呈多角形,单核。培养第 30 天时出现钙结节,呈棕黑色。钙-钴法染色成骨细胞胞质呈黑色,染色阳性的细胞数超过 75%。

2. 培养细胞上清碱性磷酸酶(U/L)及骨钙素(ng/ml)的含量见表 1。

表 1 成骨细胞碱性磷酸酶(U/L)、骨钙素(ng/ml)测定结果

指标	IGF-1			
	0 ng/ml	10 ng/ml	20 ng/ml	50 ng/ml
碱性磷酸酶	7.5 ± 0.5	9.5 ± 0.6*	8.5 ± 0.5	9.0 ± 0.7
骨钙素	1.265 ± 0.218	1.468 ± 0.245*	1.363 ± 0.311	1.367 ± 0.242

注:与 0 ng/ml 组比较,* $P < 0.05$

细胞在不同剂量 rhIGF-1 作用下其生长有所不同,在 10 ng/ml 下其生长较快。碱性磷酸酶的分泌量较多,与其他组比较差异有显著性($P < 0.05$),骨钙素含量提高明显,与其他组比较差异有显著性($P < 0.05$)。

3. MTT 测细胞生长曲线

MTT 法测不同浓度 IGF-1 对成骨细胞增殖的影响,见图 1。

4. 成骨细胞 OPG、RANKL 基因 mRNA 的表达

总 RNA 电泳出现 28s, 18s, 5s 三条带,说明 RNA

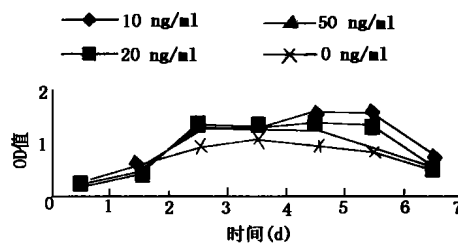


图 1 成骨细胞的生长曲线

完整,光密度比值 OD_{260}/OD_{280} 在 1.7 ~ 2.0 之间。成骨细胞 OPG 基因 mRNA 表达在 IGF-1 为 10 ng/ml 时最强,与 20 ng/ml, 50 ng/ml 组比较差异有显著性($P < 0.05$), rhIGF-1 的 3 个剂量组与 0 ng/ml 组比较差异均有非常显著性($P < 0.01$)。成骨细胞 RANKL 基因 mRNA 表达在 IGF-1 为 10 ng/ml 时最强,与 20 ng/ml, 50 ng/ml 组比较差异有显著性($P < 0.05$), 0 ng/ml 时几乎不表达。成骨细胞 OPG 与 RANKL 基因表达差异有非常显著性($P < 0.01$)。

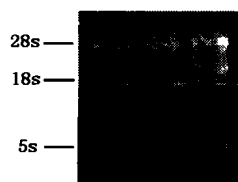


图 2 总 RNA 电泳图

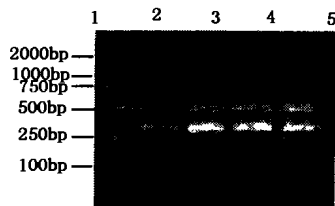


图 3 OPG 与 β -actin 基因 mRNA 表达

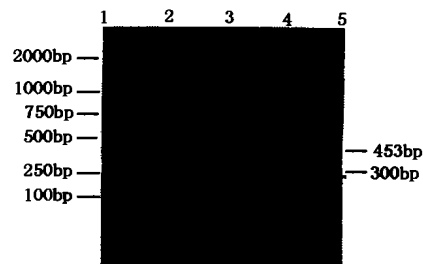


图 4 RANKL 与 β -actin 基因 mRNA 表达

讨 论

IGF 是一族结构上类似于胰岛素原、依赖于生长激素(GH)的多肽,主要包括 IGF-I 和 IGF-II。IGF-I 能刺激软骨细胞的增生和分化,刺激培养成骨细胞的生长和分化,兴奋骨细胞的增殖,刺激 I 型胶原的合成和碱性磷酸酶活性以及骨钙素的产生。在一引进成骨细胞系 IGF-I 能选择性刺激细胞膜的磷运转,对骨形成非常重要。IGF-I 和 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对碱性磷酸酶活性的影响及对胶原合成有协同作用^[6]。IGF-I 能抑制胶原的降解,老年性骨形成减少,可能与 IGF-I 局部表达减少和成骨细胞对 IGF-I 的应答反应改变有关。对老年大鼠股部局部注射 IGF-I 后 I 型胶原、碱性磷酸酶等的表达和

骨钙分泌增加 0.4 ~ 0.5 倍。同时显著增加类骨质体积表面积、成骨细胞数量和成骨细胞表面积,骨形成速率增加 81%。表明 IGF-I 不仅对生长期的骨质有促进作用,对成年鼠的骨量维持及机械强度有正面的影响^[7]。健康老年人血中 IGF-1 水平较年轻人低 30% ~ 40%,女性绝经后血清 IGF-1 水平明显低于绝经前,骨骼中 IGF-1 含量亦随年龄增加而下降^[8,9]。显示 IGF-1 调节的紊乱是原发性骨质疏松重要病理机制之一。

本实验中,碱性磷酸酶和骨钙素含量在加入 rhIGF-1 后提高,说明 rhIGF-1 的作用促进成骨细胞形成、活性增加,与上述的报道相符且在低剂量下增殖较快。

IGF-1 是成骨细胞和破骨细胞功能的主要局部

调节因子之一。是骨生成的强刺激因子,也对破骨细胞的前体细胞分化为破骨细胞有促进作用,其对骨形成和骨吸收均有增加, Mochizuki 将破骨细胞与一定剂量的 IGF-1 共同培养发现,破骨细胞的活性增强,抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色阳性的多核细胞数目增加,提示破骨细胞形成增加。用脾制备的无骨基质的血胚细胞经培养后,在 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)存在的情况下,IGF-1 可使 TRAP 阳性的细胞数目增多,表明 IGF-1 对破骨细胞的前体细胞分化为破骨细胞有促进作用。多种激素及细胞因子可影响破骨细胞形成及功能,研究表明其中大多数可调节 OPG、RANKL 表达,对骨吸收的影响可通过调节 OPG、RANKL 表达来实现。

本实验首次研究 rhIGF-1 对 OPG、RANKL 的调节作用,表明 rhIGF-1 上调成骨细胞 OPG、RANKL 基因 mRNA 的表达,说明 rhIGF-1 促进成骨的作用可能也通过调节 OPG、RANKL 来实现的,一定剂量的 rhIGF-1 促进成骨的作用可能也通过调节 OPG、RANKL 来实现的,一定剂量的 rhIGF-1 使成骨与破骨形成新的平衡,骨形成大于骨吸收,使骨重建。低剂量的 rhIGF-1 增强细胞的增殖活性和 OPG、RANKL 基因 mRNA 的表达。高剂量的 rhIGF-1 起抑制作用。这符合细胞因子在低浓度下起刺激作用,而在高浓度下起抑制作用的普遍规律^[10]。

GM-CSF 和 OPGL 是破骨细胞生成必须的而且是仅有两种因子,但 OPGL-RANK-OPG^[11,12] 环路则是最主要的调节破骨细胞分化和功能的系统,在骨微环境中其他细胞因子都是通过影响这一环路而起作用的。因此,研究细胞因子等对 OPGL-RANK-OPG 环路的影响和关系将为进一步明确骨质疏松的发生机理及治疗开拓新的领域。OPG、RANKL 对骨形成和骨吸收的重要调节作用,已成为骨科学、口腔科

学、药理学和免疫学等领域的研究热点。

参 考 文 献

- 1 Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, et al. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol*, 2002, 169:3353-3362.
- 2 Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 234:137-142.
- 3 Morony S, Capparelli C, Lee R, et al. A chimeric form of osteoprotegerin inhibits hypercalcemia and bone resorption induced by IL-1 β , TNF- α , PTH, PTHrP and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. *J Bone Miner Res*, 1999, 14: 1478-1485.
- 4 薛庆善,主编. 体外培养的原理与技术. 北京:科学出版社, 2001.485-486.
- 5 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1990.42.
- 6 Zofklora I, Kancheva RL, Bendlova B. Effect of $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin D_3 on circulation insulinlike growth factor- I and beta2 micro globulin in patients with osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 1997, 60:236-239.
- 7 Wakisaka A, Tanaka H, Barnes J, et al. Effect of locally infused IGF-1 on femoral gene expression and bone turnover activity in old rats. *J Bone Miner Res*, 1998, 13:13-19.
- 8 Mohan S, Baylin DJ. Serum insulin-like growth factor binding protein IGF-BP-4 and IGFBP-5 levels in aging and age-associated diseases. *Endocrine*, 1997, 7:87-91.
- 9 Rogers A, Saleh G, Hannon RA, et al. Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87:4470-4475.
- 10 杨贵贞,主编. 免疫生物工程纲要与技术. 长春:吉林科技出版社出版,1991.28-73.
- 11 刘继中,纪宗民,陈苏民. OCIF/OPG 的结构与功能. *细胞与免疫学杂志*, 2001, 17(3):61-63.
- 12 Stejskal D, Zurek M, Bartek J, et al. Osteoprotegerin and bone density. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2001, 145(2):75-76.

(收稿日期:2002-10-21)