

Miyabenol C 和 kobophenol A 防治骨质疏松作用机制的初步研究

田春艳 高海东 徐光 胡昌奇 宋后燕

【摘要】 目的 研究 Miyabenol C(Miy C)和 Kobophenol A(Kob A)的选择性雌激素受体调节剂(selective estrogen receptor modulators, SERMs)的性质及其在防治骨质疏松中的机制。**方法** 运用 MTT 实验,检测它们对类成骨细胞和子宫内膜癌细胞增殖的影响,以及半定量 RT-PCR 技术检测它们对 IL-6 基因转录水平的影响。**结果** Miy C 和 Kob A 对大鼠的类成骨细胞有促增殖作用,对子宫内膜癌细胞无促增殖作用,使 IL-6 的 mRNA 水平降低。**结论** Miy C 和 Kob A 具有 SERMs 的特点,具有防治骨质疏松的作用。

【关键词】 植物雌激素; IL-6 基因; 骨质疏松

Mechanism of Miyabenol C and Kobophenol A in preventing osteoporosis TIAN Chunyan, GAO Haidong, XU Guang, et al. Laboratory of Molecular Genetics, Shanghai Medical School, Fudan University, Shanghai 200032, China

【Abstract】 Objective To explore the characteristics of Miy C or Kob A, selective estrogen receptor modulators (SERMs), and their roles in prevention of osteoporosis. **Methods** MTT assay was used to detect their effects on the proliferation of rat osteoblast-like cells and human uterine endometrium cancer cells RL 95-2. By means of semi-quantitative RT-PCR, the mRNA levels of IL-6 in rat osteoblast-like cells were measured. **Results**

Miy C or Kob A stimulated the proliferation of rat osteoblast-like cells, but did not stimulate RL95-2 cells. The IL-6 mRNA level was decreased. **Conclusion** Miy C and Kob A have shown the characteristics of SERMs, and it is possible to use them for prevention of osteoporosis.

【Key words】 Phytoestrogen; IL-6 gene; Osteoporosis

骨组织是雌激素的靶组织之一。在成骨细胞和破骨细胞上均有雌激素受体(estrogen receptor, ER)的存在,类雌激素样物质在骨骼的生长及骨密度的维持中起着重要的作用^[1-5]。

目前雌激素替代性疗法广泛用于治疗女性更年期综合征及防治绝经后骨质疏松及其引发的骨折。在此过程中,人们发现虽然雌激素可以有效缓解病情,但有较多的不良反应。雌二醇在靶细胞中的代谢产物 4-羟基雌酮和 16 α -羟基雌酮可与染色体 DNA 结合使其损伤并进行错误修复,从而使雌激素靶组织肿瘤的发生率增高^[6],与雌激素对靶细胞的促增殖作用相结合增加了乳腺癌及子宫内膜癌的发生率。

在寻找替代天然雌激素治疗女性更年期综合

征,防治绝经后骨质疏松的过程中,选择性雌激素受体调节剂(selective oestrogen receptor modulators, SERMs)引起了人们的注意^[7,8],它们是具有组织特异性的雌激素样作用的物质,在一些靶组织中具有类雌激素样作用,而在另外一些靶组织中具有抗雌激素样的作用。植物雌激素(phytoestrogen)是一种由植物来源的非甾体类雌激素物质,也属于 SERMs。其中多种植物雌激素可降低血清总胆固醇、LDL,轻微缓解潮热等更年期症状,抑制去卵巢小鼠骨密度的降低。目前还没有植物雌激素促进子宫内膜增生的报道。因此,植物雌激素的研究与开发为更年期综合征与绝经后骨质疏松的防治提供了广阔的前景^[9,10]。

Miyabenol C(Miy C)和 Kobophenol A(Kob A)是中草药金雀根活性部位(extract of *Caragana sinica*, ECS)的两种有效成分^[11]。研究结果已证实它们具有弱

作者单位:200032 上海,复旦大学上海医学院分子遗传教研室(田春艳、徐光、胡昌奇、宋后燕);山东大学齐鲁医院普外科(高海东)

的雌激素样作用,可以通过 ER 促进 MCF-7 细胞的增殖^[12]。为了研究 Miy C 和 Kob A 在防治骨质疏松中的作用及是否具有 SERMs 的特点,我们检测了它们对大鼠的类成骨细胞及人的子宫内膜癌细胞 RL-952 细胞生长的影响。笔者还以大鼠的类成骨细胞为靶细胞检测 Miy C 和 Kob A 对 IL-6 表达的影响,进一步探讨 Miy C 和 Kob A 在防治骨质疏松中的机理。

材料和方法

1. 材料

(1)细胞株:RL-952, MCF-7 细胞株为本室保存;大鼠的类成骨细胞由复旦大学放射医学研究所王洪复教授赠送。在 37℃、5% CO₂ 浓度下培养于含 10% 小牛血清,10 mg/L 的牛胰岛素,100 IU/ml 的青霉素和 100 μg/ml 的链霉素的 RPMI 1640 培养液中。在进行所有实验之前,细胞至少要在无雌激素培养液中生长 2 d。无雌激素培养液为无酚红的 RPMI 1640,并含有 10% Dextran T70 包被的活性炭处理的小牛血清^[12]。

(2)检测样品:天然产物样品(Miy C 和 Kob A)由复旦大学药学院天然药化教研室胡昌奇教授提供,以 0.1 mol/L 的储存浓度溶于二甲亚砜中。

(3)寡聚核苷酸:由上海生工生物工程公司及赛百盛公司制备。

(4)试剂:RPMI 1640 购自 GibcoRBL 公司;17β-雌二醇(E₂)、二甲亚砜(DMSO)、牛胰岛素(bovine insulin)、和金雀异黄素(genistein, Gen)购自 Sigma 公司;Dextran T70 购自 Pharmacia Biotech 公司;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)购自 Promega 公司。其他试剂均为进口或国产分析纯。

2. 方法

(1)细胞增殖实验:用 MTT 实验检测细胞的增殖。在第 1 天细胞以 2 × 10³ 个/孔的浓度接种于 96 孔板中,24 h 后,吸出培养液,加入 200 μl 含有相应药物的培养液。所有的药物溶于 DMSO,加入培养液时以 1:1 000 稀释,在第 6 天结束实验。用 MTT 实验检测细胞的增殖。每组细胞重复 3 次^[12]。

(2)RT-PCR:大鼠的类成骨细胞在无雌激素培养液中培养 2 d 后加入含有相应药物的培养液,所有的药物溶于 DMSO,加入培养液时以 1:1000 稀释。以华舜公司的 RNAex Reagent & Systems 抽提上述条件下培养细胞的总 RNA。

引物设计 IL-6:5'-CAGTTCCTGCAGAAAAAGGC-

3'(Exon 3);5'-AACAACAARCTGAGGRGCCC-3'(Exon 5)

产物长度为:208 bp。

β-actin:5'-CCTCTAATGCCAACACAGTGC-3';

5'-GTACTCCTGCTTGCTGATCC-3'

产物长度为 211 bp。

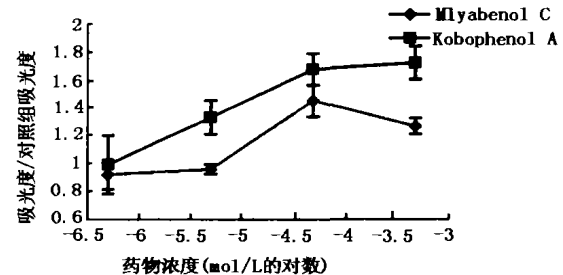
RT 反应和 PCR 反应按照 Promega 公司 RT-PCR 试剂盒的操作说明进行,对 IL-6 基因进行 RT-PCR 反应时的变性温度为 55℃,对基因变性温度为 54℃。

取 5 μl 扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴已锭染色,应用成像系统对电泳条带进行密度扫描定量。IL-6 的相对水平以 IL-6 与 β-actin 扫描的凸光度值的比值表示。

结果

1. Miy C 和 Kob A 对大鼠类成骨细胞生长的影响

Miy C 和 Kob A 均可促进大鼠类成骨细胞的增殖。在 50 μmol/L 的浓度以内,随浓度的增加 Miy C 和 Kob A 促进细胞增殖的作用逐渐增加;超过 50 μmol/L, Miy C 促进细胞生长的作用降低,而 Kob A 对细胞的促增殖作用进入平台期,见图 1。



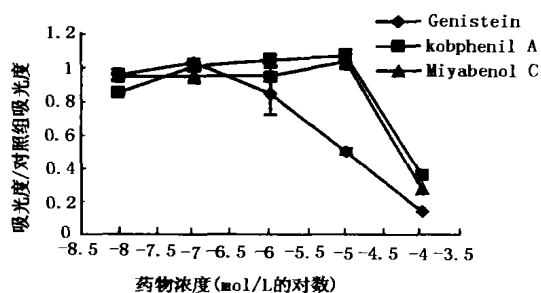
注:不同浓度的 Miy C 和 Kob A 处理细胞 4d 后,MTT 法检测细胞的增殖,每组细胞重复 3 次。

图 1 Miy C 和 Kob A 对大鼠类成骨细胞生长的影响

2. Miy C 和 Kob A 对 RL95-2 细胞生长的影响

Gen(典型的植物雌激素)、Miy C 和 Kob A 对 RL95-2 细胞的生长均无促进作用。Miy C 和 Kob A 在 10 μmol/L 的浓度后,出现对细胞生长的抑制作用,它们的半效抑制浓度相似。Gen 对细胞生长的抑制作用大于 Miy C 和 Kob A,且出现抑制作用的浓度低于 Miy C 和 Kob A,见图 2。

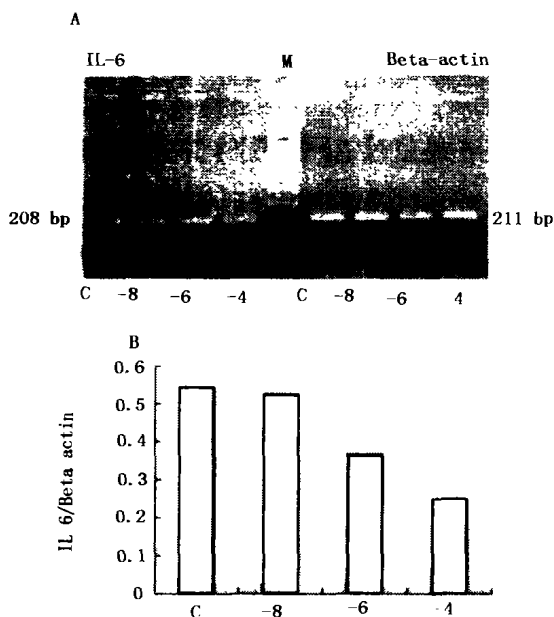
3. Miy C 对大鼠的类成骨细胞中 IL-6 mRNA 水平的影响



注:不同浓度的 Miy C 和 Kob A 处理细胞 4 d 后,MTT 法检测细胞的增殖,每组细胞重复 3 次。

图 2 Miy C 和 Kob A 对 RL95-2 细胞生长的影响

Miy C 在 $1 \mu\text{mol/L}$ 时降低 IL-6 的 mRNA 水平,且对 IL-6 mRNA 水平的抑制作用随浓度的增加而增加。



Miy C (mol/L 的对数)

(A) RT-PCR (M: 100 bp DNA 标记物; C: 0.01% DMSO)

(B) 相对定量分析 IL-6 的 mRNA 水平

图 3 不同浓度的 Miy C 对大鼠类成骨细胞中 IL-6 mRNA 水平的影响

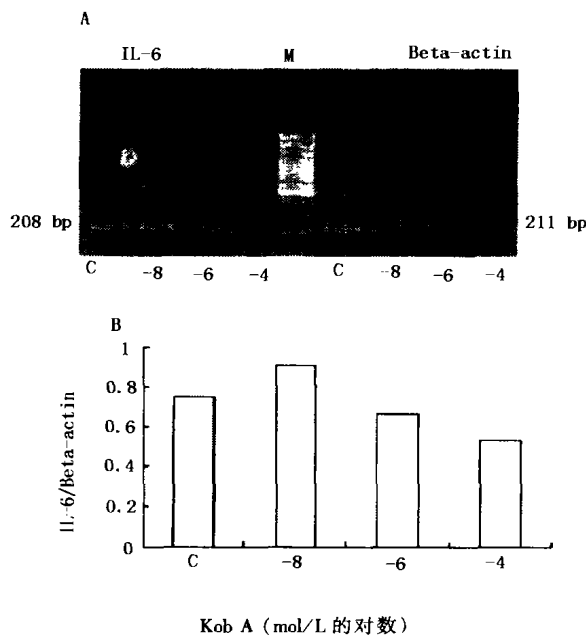
4. Kob A 对大鼠的类成骨细胞中 IL-6 mRNA 水平的影响

Kob A 在 $100 \mu\text{mol/L}$ 时明显降低 IL-6 的 mRNA 水平。

讨 论

雌激素对骨密度的维持是通过对成骨细胞和破骨细胞的协同调节完成的。雌激素与成骨细胞中的

ER 结合后,激活 ER 使之与雌激素受体反应元件 (estrogen receptor response element, ERE) 结合,促进下游某些生长因子及原癌基因的表达,从而促进成骨细胞的增殖。笔者以大鼠的类成骨细胞为靶细胞检



Kob A (mol/L 的对数)

(A) RT-PCR (M: 100 bp DNA 标记物; C: 0.01% DMSO)

(B) 相对定量分析 IL-6 的 mRNA 水平

图 4 不同浓度的 Kob A 对大鼠类成骨细胞中 IL-6 mRNA 水平的影响

测了 Miy C 和 Kob A 对成骨细胞的促增殖作用。在 $50 \mu\text{mol/L}$ 的浓度以内,它们可以促进大鼠类成骨细胞的增殖,随浓度的增加 Miy C 和 Kob A 促进细胞增殖的作用逐渐增加。

IL-6 是破骨细胞分化中重要的细胞因子,雌激素对破骨细胞的调节是通过影响 IL-6 的分泌与表达完成的。一方面,雌激素在激活 ER 后可通过降低细胞中 IL-6 调节因子、IL-1 及肿瘤坏死因子 α 的表达量,使成骨细胞及骨基质细胞中 IL-6 的表达及分泌下降,从而抑制破骨细胞的分化^[13]。另一方面,因为 NF κ B 是促进 IL-6 表达的主要调节因子之一,激活的 ER 可通过调节 NF κ B 的转录活性,影响 IL-6 的表达。首先,ER 与 NF κ B 竞争核内转录因子的协同激活因子如: C/EBP 等,降低其转录活性^[5],而且 ER 还可与 NF κ B 形成异源二聚体,使之不可与相应的反应元件结合,抑制其转录活性^[5]。我们检测了 Miy C 和 Kob A 对大鼠的类成骨细胞中 IL-6 基因表达的影响。它们可抑制大鼠的类成骨细胞中 IL-6 基因的转录,说明它们也可通过对破骨细胞及其周围

细胞中 IL-6 基因转录的调节,从而影响破骨细胞的分化维持骨密度。

RL95-2 细胞是人的子宫内膜癌细胞,为 ER 阳性细胞株,对 E₂ 的反应敏感,我们以它为靶细胞检测 Gen、Miy C 和 Kob A 对子宫内膜细胞生长的影响。结果显示:在任何浓度下它们不能促进细胞的增殖,这与目前植物雌激素没有促进子宫内膜增生的报道相符合。Miy C 和 Kob A 对大鼠类成骨细胞出现最大增殖效应的浓度略低于作用于人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞株^[12],说明对雌激素不同的靶组织, Miy C 和 Kob A 表现出不同的作用,符合 SERMS 的作用特点。选择适合的 SERMs 治疗和预防妇女绝经后因雌激素水平下降引起的多种慢性疾病有着非常重要的意义。

参 考 文 献

- Smith EP, Boyd J, Frank GR, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in estrogen receptor gene in a man. *New Engl J Med*, 1994, 331: 1056-1061.
- Morshima A, Grumbach MM, Simpson ER, et al. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80:3689-3698.
- Ritzen EM, Nilsson O, Grigoriou G, et al. Estrogens and human growth. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2000, 74: 383-386.
- Galien R, Evans HF, Garcia T. Involvement of CCAAT/enhancer-binding protein and nuclear factor-NFkB binding sites in interleukin-6 promoter inhibition by estrogen. *Endocrinology*, 1996, 10: 713-712.
- Van der Burg B, Van der Saag PT. Nuclear factor-kappa-B/steroid hormone receptor interactions as a functional basis of anti-inflammatory action of steroids in reproductive organs. *Mol Hum Reprod*, 1996, 2: 433-438.
- Service RF. New role for estrogen in cancer. *Science*, 1998, 279: 1631-1633.
- Davis SR. Postmenopausal hormone-replacement therapy. *N Engl J Med*, 2002, 346: 63-65.
- Lufkin EG, Wong M, Deal C. The role of selective estrogen receptor modulators in the prevention and treatment of osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am*, 2001, 27: 163-15.
- Wang TY, Santhymoorthy N, Phang JM. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis*, 1996, 17: 271-275.
- Kitaoka M, Kadokawa H, Sugano M, et al. Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (part I). Isolation of 8-isopentenyl-naringenin and an initial study on its structure-activity relationship. *Planta Med*, 1998, 64:511-515.
- Luo HF, Zhang LP, Hu CQ. Four stilbene oligomers from the roots of *Caragana sinica*. *J Chin Pharm Sci*, 2000, 9: 162-16.
- Tian CY, HU CQ, Xu G, et al. Assessment of the estrogenic activity of natural compounds: using improved E-screen assay. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23:572-576.
- Galien R, Evans HF, Garcia T. Involvement of CCAAT/enhancer-binding protein and nuclear factor-NFkB binding sites in interleukin-6 promoter inhibition by estrogen. *Endocrinology*, 1996, 10: 713-712.

(收稿日期:2003-01-15)