

缺氧诱导成骨细胞 VEGF mRNA 的 RT-PCR 表达

戴俊峰 王稚英 王海燕

【摘要】 目的 观察在体外缺氧条件下,SD大鼠成骨细胞 VEGF mRNA 表达的变化。**方法** 酶消化法收集培养 SD 大鼠颅骨成骨细胞,用高纯氮气造成缺氧环境,应用 RT-PCR 技术观察不同时间段 VEGF mRNA 表达的改变。**结果** 缺氧 6 h 后,VEGF mRNA 明显增加,缺氧 12 h 后,增至顶峰,缺氧 24 h 后开始下降,缺氧 48 h 接近正常水平。**结论** 缺氧在转录水平调节成骨细胞 VEGF 的表达。

【关键词】 VEGF;mRNA;RT-PCR;缺氧;成骨细胞

Hypoxia induces RT-PCR expression of osteoblast VEGF mRNA DAI Junfeng, WANG Zhiying, WANG Haiyan Department of Oral Maxillofacial Surgery, Affiliated Hospital of Jinzhou Medical College, Jinzhou 121001, China

【Abstract】 Objective To investigate the expression changes in Sprague-Dawley rat osteoblast VEGF mRNA after hypoxia induction *in vitro*. **Methods** Osteoblasts were collected from the calvaria of fetal rat using type II collagenase, then exposed to hypoxia for different time. The levels of osteoblast VEGF mRNA were detected by RT-PCR. **Results** The expression of VEGF mRNA increased significantly at 6h after exposure to hypoxia, and reached peak at 12h, but decreased at 24 h. The level of VEGF mRNA was similar to that in the control group at 48h in hypoxia. **Conclusion** Hypoxia regulates the expression of osteoblast VEGF at transcription level.

【Key words】 VEGF; mRNA; RT-PCR; Hypoxia; Osteoblasts

骨损伤后新骨生成依赖于血管的再生,血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)是迄今发现的最强的一种血管生成因子。本实验用 RT-PCR 技术,观察缺氧诱导成骨细胞 VEGF mRNA 表达的规律。

材料和方法

1. 成骨细胞的培养

取新生 24 h 内 SD 大鼠 3 只(北京大学医学部动物中心提供),无菌取下颅骨,适量 1 mg/ml 的 II 型胶原酶(Gibco),消化、收集细胞悬液。重复 4~5 次,送 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。差速粘附法纯化成骨细胞,并按 1:2 的比例传代。取第 3 代成骨细胞作为实验对象。

2. 骨钙素免疫组化染色

待成骨细胞达到 70% 汇合后,用骨钙素多克隆

抗体(Santa Cruz)和山羊抗兔二抗(Santa Cruz)及卵白素过氧化物酶标记,DAB 显色。

3. 缺氧条件下培养成骨细胞

(1)缺氧装置的设计:取与 100 ml 培养瓶口相适的橡皮塞,在塞上插两个 12 号针头,做进气孔和出气孔。高纯氮气经过滤,由进气孔充入培养瓶。从出气孔随机抽气进行血气分析(美国 ST-III 血气分析仪),控制氧分压为 2.5 mmHg,密封。

(2)缺氧培养方案:取 5 瓶第 4 代细胞,分为 A、B、C、D、E 5 组。更换 pH 为 7.6 的无血清培养基,应用上述装置将 A、B、C、D、E 分别缺氧 0, 6, 12, 24 和 48 h,培养时间均为 48 h。

4. 提取成骨细胞总 RNA

根据 RNA 提取盒(鼎国)的步骤,提取总 RNA。紫外扫描仪(6405 US, Jenw AY)测 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值。琼脂糖凝胶电泳检查所提 RNA 的质量,其余-80℃保存。

5. RT-PCR 扩增 VEGF mRNA

(1)RT 反应:根据试剂盒(鼎国)说明,20μl 反应

体系加 3 μ g 总 RNA, 放 PCR 仪(美国 Genius HB-1D 型)内进行逆转录, 产物 -20 $^{\circ}$ C 保存。

(2)PCR 扩增 β -actin: 50 μ l 反应体系加 RT 产物 4 μ l, 按试剂盒的说明设定反应参数。

(3)PCR 扩增样本: 50 μ l 反应体系加 RT 产物 4 μ l, 特异性引物上下游各 50pmol, VEGF 引物序列^[1] (上海基康公司代为合成)为:

Sense: 5'TCACCGCCTTGGCTTGTACAT 3'

Antisense: 5' TGCACCCACGACAGAAGGGGA 3'

反应参数: 94 $^{\circ}$ C 5 min $\rightarrow$ 28 循环: 94 $^{\circ}$ C 1 min; 61 $^{\circ}$ C 45 s; 72 $^{\circ}$ C 45 s; 72 $^{\circ}$ C 5 min $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C Hold。

6. 电泳: 取 PCR 产物 8 μ l, 以 DL-2000 (Takara) 为标准, 低压平板电泳, 采集分析图象。

结 果

1. 骨钙素免疫组化染色: 成骨细胞胞浆中可见棕黄色颗粒, 大小不均(图 1)。



图 1 骨钙素免疫组化染色($\times 400$)

2. 各组 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值均在 1.8 以上, 且 RNA 电泳见 28 S, 18 两条带, 丰度好, 28 S: 18 S $\geq 2: 1$ 。

3. RT-PCR 结果

RT 产物经 PCR 扩增得到约 565bp 和 430bp 两个主要片段(图 2), 与其他研究符合^[2]; 内参(β -actin) 片段为 540bp, 符合预计结果, 且亮度相当(图 2)。光密度扫描分析(Image-proplus USA)结果如表 1。从中可见缺氧 6 h VEGF mRNA 开始增加, 12 h 增至顶峰, 24 h 下降, 48 h 接近正常水平。

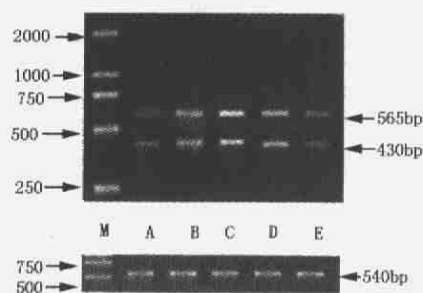


图 2 VEGF RT-PCR 产物及相应的内参结果

表 1 缺氧后 VEGF 表达(OD), ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	565bp	430bp
A	3	46.67 $\pm$ 2.08	64.33 $\pm$ 1.15
B	3	105.33 $\pm$ 2.52 ^{**}	104.17 $\pm$ 2.47 ^{**}
C	3	119.33 $\pm$ 5.86 ^{**}	118.27 $\pm$ 5.75 ^{**}
D	3	93.67 $\pm$ 3.06 ^{**}	96.23 $\pm$ 3.33 ^{**}
E	3	51.00 $\pm$ 4.00	62.17 $\pm$ 1.61

注: 与对照组相比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

骨组织的损伤、骨折的愈合及改建, 股骨头坏死等是骨科及骨相关学科的常见疾病, 这些疾病的发生、发展皆与局部血供变化有关。新形成的血管促进新骨的形成, 在新骨生成之前, 首先发生的是血管的侵袭, 新骨发生在新生血管的附近, 血管转运骨祖细胞, 分泌分裂原始成骨细胞, 并提供养分和氧气^[3]。影响血供变化的因素很多, 目前公认 VEGF 是最强的血管生成因子, 成骨细胞能够表达 VEGF, 缺氧是诱导 VEGF 产生的最有效因素。

骨折、骨缺损等疾病均可造成局部血管断裂、缺血、缺氧、乳酸含量增加及 pH 值下降。Jason A^[4]等在实验中发现酸性环境抑制成骨细胞 VEGF mRNA 的生成。本实验结果显示缺氧 6 h, 成骨细胞 VEGF mRNA 明显增加, 缺氧 12 h 达顶峰, 随后开始下降, 至缺氧 48 h 时, 与对照组 A 无明显差异。Steinbrech 等也得出先增加后降低的趋势^[5]。本实验中各组 pH 值有不同程度的降低。其中缺氧 48 h 组 pH 值和 VEGF 表达量均是最低的。这提示细胞在代谢过程中产酸, 短时间缺氧细胞会产生适应性反应, 长期缺氧可能导致细胞数减少及抑制成骨细胞合成 VEGF mRNA。

VEGF 表达的增强, 有利于损伤处骨组织的修复重建。成骨和血管化是不可分割的, 成骨细胞总是与血管床的内皮细胞紧密相邻。成骨细胞在缺氧条件下分泌 VEGF, VEGF 有促进内皮细胞增殖和保护内皮细胞的作用, 而内皮细胞又能合成分泌一系列可溶性调节因子, 如 FGF, IL-1, CSFs, PGE, ET-1 等, 这些因子具有控制成骨细胞募集、增殖及分化等作用。成骨细胞和内皮细胞相互作用, 促进血管化, 以带来养分和新的成骨细胞, 完成骨组织的修复重建工作。由于 VEGF 蛋白在体内的半衰期短(≤ 6 min), 且价格昂贵, 临床应用受到局限。人们试图通过基因技术, 使成骨细胞持续、稳定表达 VEGF, 但目前仍处在动物研究阶段。

(下转第 146 页)

物学研究、老年时期骨衰退机制研究和防治药物研究的重要手段^[3]。实验动物月龄、评价指标和考察部位等的选择直接影响到实验结果和细胞学机制的分析判断以及实验数据的参考价值。

骨量峰值和骨量丢失月龄的确定是动物月龄选择的关键,目前对此仍存在争议。如对 SD 雄性大鼠的研究结果表明,腰椎 BMD 等指标在 4 月龄可达到平台,13 月龄后开始降低,而股骨 9 月龄开始降低,同时 9 月龄骨生长停止、腰椎皮质变薄,故认为雄性 SD 大鼠骨量丢失开始于 9 月龄^[4]。然而有研究发现小梁骨在 12 月龄后仍有增加^[5]。本文结果也显示大鼠股骨和腰椎生长(体积增大)分别可持续到 12 月龄(雌性)和 18 月龄(雄性)。骨密度峰值位于 7~12 月龄,与文献报道皮质骨峰值区间 6~12 月龄接近,处于小梁骨密度峰值的 6~21 月龄范围内^[5]。16 月龄后腰椎骨量明显丢失,晚于股骨骨量丢失的 12 月龄,并以早期的快速丢失为特征,18 月龄以后骨密度变化不大。腰椎最大抗压力出现在 12 月龄,股骨最大抗弯力出现在 12 月龄(雌性)和 18 月龄(雄性),略滞后于骨量峰值月龄,反映力学结构调整和骨体积变化对生物力学功能的影响。12 月龄后小幅减低(与密度一致),而 P 含量相对维持稳定,股骨中 Ca/P 比值增加,其原因有待研究。镁含量随年龄变化不大,1 月龄大鼠腰椎 Mg 含量高水平可能与其尚未矿化有关。

骨密度、生物力学和 Ca 含量的性别差异主要表现在股骨,可能与性激素差异和骨建造位点的分布有关。文献报道 3 月龄大鼠椎骨的骨建造位点为 17.1%,而胫骨为 61.6%^[6]。发育期雌性骨量增加

早于雄性^[7]。因此,性激素差异可能造成骨建造水平的不同,如骨建造活动启动时间、强弱、延续时间等,这些差异在皮质骨中表现的更明显。

由以上研究可以认为,大鼠骨骼系统尤其是腰椎等中轴骨在 7 月龄时已基本完成塑形,7~12 月龄主要表现为内在力学结构的调整,密度相对恒定,矿盐含量略有减低而力学特性进一步改善。12 月龄以后出现骨量丢失,12~16 月龄可能为一度快速丢失阶段。18 月龄以后丢失减缓,同时可能存在代偿性骨形成增加,密度维持稳定,而力学性能未得到改善。

参 考 文 献

- 1 Martin B. Aging and strength of bone as a structural material. *Calcif Tissue Int*, 1993, 53(Suppl):S34-40.
- 2 吴小涛,戴克戎,袁世静. 老年与青年股骨头内松质骨组织形态计量学比较研究. *中国骨质疏松杂志*, 2000, 6:26-28.
- 3 Banu J, Kalu DN. Effects of cerivastatin and parathyroid hormone on the lumbar vertebra of aging male Sprague-Dawley rats. *Bone*, 2002, 31:173-179.
- 4 Wang L, Banu J, McMahan CA, et al. Male rodent model of age-related bone loss in men. *Bone*, 2001, 29:141-148.
- 5 Iida H, Fukuda S. Age-related changes in bone mineral density, cross-sectional area and strength at different skeletal sites in male rats. *J Vet Med Sci*, 2002, 64:29-34.
- 6 Erben RG. Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: modeling or remodeling? *Anat Rec*, 1996, 246:39-46.
- 7 Wang L, McMahan CA, Banu J, et al. Rodent model for investigating the effects of estrogen on bone and muscle relationship during growth. *Calcif Tissue Int*, 2003, 72:151-155.

(收稿日期:2003-08-28)

(上接第 151 页)

总之,本实验研究认为,适宜的缺氧环境有利于成骨细胞 VEGF mRNA 的表达和 VEGF 的分泌,过度的缺氧环境抑制成骨细胞 VEGF mRNA 的表达和 VEGF 的合成。本实验通过缺氧的损伤环境模拟临床相关骨科疾病的缺氧过程,探讨体外培养成骨细胞表达 VEGF mRNA 的规律及部分影响因素,了解临床上相关疾病的发生机理,为今后选择治疗时机和利用有利因素(缺氧)提供参考,并为实现骨缺血、缺氧性疾病的临床 VEGF 基因治疗打下理论基础。

参 考 文 献

- 1 Burchardt A, Burchardt T, Chen MW, et al. Expression of messenger ribonucleic acid splice variants for vascular endothelial growth factor in the penis of adult rats and humans. *Biol Reprod* 1999, 60:398-404.
- 2 Yeh LCC, Lee JC. Osteogenic pron-1 increases gene expression of vascular endothelial growth factor in primary cultures of fetal rat calvaria cells. *Molecular and Cellular Endocrinol*, 1999, 153:113-124.
- 3 Schor AM, Canfield AE, Sutton AB, et al. Pericyte differentiation. *Clin Orthop*, 1995, 313:81-91.
- 4 Jason A, Babak J, Joshua A, et al. Osteoblast expression of vascular endothelial growth factor is modulated by the extracellular microenvironment. *AJP-Cell Physiology*, 2000, 280:C72-C80.
- 5 Douglas S, Steinbrech MD, Babak J, et al. Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts in vitro. *Plast Reconstr Surg*, 1999, 104:738-747.

(收稿日期:2003-06-20)