·论著·

Genistein对破骨细胞分化和骨吸收功能的影响及其机制探讨

李斌斌 于世凤

【摘要】 **目的** 探讨三羟异黄酮类药Genistein对破骨细胞性骨吸收的作用及其机制。**方法** 1,25(OH)$_2$D$_3$诱导小鼠骨髓细胞形成破骨样细胞,分别加入0 mol/L、10^{-9} mol/L、10^{-8} mol/L、10^{-7} mol/L、10^{-6} mol/L、10^{-5} mol/L Genistein,于培养3,5和8 d分别计数抗酒石酸酸性磷酸酶阳性细胞个数;于培养12 d利用图像分析系统对骨吸收陷窝的面积进行测量分析。另从小鼠颅盖骨分离培养获得原代成骨细胞,分别加入0,10^{-8},10^{-7},10^{-6}和10^{-5} mol/L Genistein并以10^{-9} mol/L 17β-雌二醇为对照,采用RT-PCR的方法检测Genistein对骨保护因子(osteoprotegerin, OPG)及破骨细胞分化因子(receptor activator of NF-κB ligand, RANKL)mRNA表达的影响。**结果** 利用1,25(OH)$_2$D$_3$成功诱导出破骨样细胞;随Genistein浓度增加,抗酒石酸酸性磷酸酶阳性细胞(单核、双核和多核)个数和骨吸收陷窝面积呈剂量依赖性减少。同时,应用Genistein后原代成骨细胞中OPG和RANKL的mRAN表达都有增强,但其最终效应表现为剂量依赖性和时间依赖性地增大OPG/RANKL的浓度比。**结论** Genistein通过抑制破骨前体细胞分化来抑制其体外骨吸收功能,其分子机制与OPG/RANKL mRNA表达比值的升高有关。

【关键词】 Genistein; 破骨细胞; 骨吸收

Effect of genistein on osteoclastic bone resorption and its mechanism *LI Binbin, YU Shifeng. Department of Oral Pathology, Peking University School of Stomatology, Beijing* 100081, China

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effect of genistein, a legume-derived isoflavone, on the osteoclastic bone resorption and to clarify the mechanism underlying this action. **Methods** Primary osteoclast-like cells (OLCs) were isolated from 3 week-old mice and induced by 1,25(OH)$_2$D$_3$. Then OLCs were exposed to genistein at various concentration of 0, 10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6} and 10^{-5}mol/L. The number of TRAP+ cells were counted as well as the surface area of bone resorption on bone slice. Additionally the osteoblasts were obtained from 5 day old mice and were exposed to 0, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6} and 10^{-5}mol/L genistein and 10^{-9}mol/L 17β-estradiol. The mRNA levels of RANKL and OPG were assayed by RT-PCR. **Results** *In vitro*, the number of TRAP+ cells decreased depending on the concentration of genistein as well as the area of bone resorption. By semiquantitative RT-PCR, genistein increased the mRNA levels of OPG and RANKL, and finally enlarged the ratio between them in dose and time-dependent mamer. **Conclusion** Genistein inhibits OLCs' bone resorption through suppressing the differentitation of preosteoclasts, and the ratio between OPG and RANKL may be the key factor.

【**Key words**】 Genistein; Osteoclast; Bone resorption

骨吸收是由破骨细胞(osteoclast, OC)执行的,通过复杂的分子生物学机制完成的矿物质溶解、有机基质吸收的过程。骨吸收时OC、成骨细胞(osteoblast, OB)、巨噬细胞、淋巴细胞等相互作用、相互制约,通过多种因素和细胞因子(如白介素、肿瘤坏死因子、骨保护因子和破骨细胞分化因子等)调控骨吸收[1,2]。随着对骨吸收机理的逐步深入研究,如何有效防治骨吸收就成为该领域的热点问题之一。

雌激素替代治疗是目前比较经典的防治骨吸收性疾病的治疗方法,但由于其具有较多的副作用,临床上对其应用还存在着较多的禁忌症和疑虑。Genistein是大豆异黄酮的主要成分之一,化学结构

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271412);北京大学"985"专项基金资助项目

作者单位:100081 北京大学口腔医学院病理研究室

李斌斌 E-mail:lbb75@tom.com

与17β-雌二醇相似，都含有多个羟基，可以与雌激素受体结合，具有雌激素样作用[3]。但由于genistein结构上不含有甾环结构和对雌激素受体的选择性[4]，其对生殖系统的副作用弱于雌激素。因此，作为植物雌激素的一种，genistein对骨吸收的抑制作用值得关注。本研究探讨genistein对破骨细胞分化、骨吸收的抑制作用及其分子机制，以明确其在骨吸收防治领域的应用价值。

材料和方法

1. 破骨样细胞培养、$TRAP^+$细胞计数及吸收陷窝面积分析

(1)盖玻片和骨磨片的制备：制备方法参见文献[5]。

(2)1,25$(OH)_2D_3$诱导小鼠骨髓细胞形成破骨样细胞和genistein的加入：培养方法参见文献[6]。将细胞悬液置于37℃、5% CO_2培养箱中培养，每3天更换新鲜培养液1次，同时加入相同浓度的1,25$(OH)_2D_3$和不同浓度的genistein(0,10^{-9},10^{-8},10^{-7},10^{-6},10^{-5} mol/L)。

(3)抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)阳性细胞计数

TRAP是OC特异性标志。细胞悬液与玻片共同培养，于培养3 d、3 d、8 d取玻片，根据试剂盒说明进行TRAP染色，光镜下观察。含2个胞核以上且呈TRAP染色阳性的多核巨细胞即为OC。OC计数在200倍光镜下进行，每例玻片任选5个视野，计数一细胞均值。

(4)破骨细胞骨吸收功能的改变：细胞悬液与骨片共同培养，采用Olympus倒置相差显微镜观察不同时间点骨片上吸收陷窝的变化，于培养第12天对陷窝进行摄影，采用Image-Pro Plus图像分析软件分析吸收陷窝面积。

2. 成骨细胞培养、鉴定及RT-PCR

(1)分离出生5 d的SD大鼠(二级，购自国家计生委动物室)的颅盖骨，去净附着于其表面的软组织和内外骨膜以及骨缝处的纤维结缔组织，用无双抗的D-Hanks液洗两遍，将颅盖骨剪为2 mm×2 mm的碎块，加入1 mg/ml胶原酶Ⅱ，37℃消化5次，每次30 min，收集细胞，接种于培养瓶中。待细胞铺满培养瓶70%时，差减贴壁法纯化OB。

(2)成骨细胞鉴定——钙钴法碱性磷酸酶染色。

(3)RT-PCR检测，取第3代OB，体外加入0 mol/L、10^{-8} mol/L、10^{-7} mol/L、10^{-6} mol/L、10^{-5} mol/L genistein和10^{-9} mol/L 17β-雌二醇，于加药后12 h，Trizol(Gibco公司)提取RNA，取2 μg总RNA用逆转录试剂盒(Promega公司)合成cDNA，PCR扩增仪上行PCR，同时扩增骨保护因子(osteoprotegerin, OPG)、破骨细胞分化因子(receptor activator of NF-κ B ligand, RANKL)和GAPDH(内参照)。引物及扩增片段长度如表1所示。反应条件：94℃变性2 min，94 ℃变性45 s，55℃退火45 s，72℃延伸1 min，35循环后，72℃后延伸5 min。PCR产物分析以1.5%琼脂糖(*W/V*) TA缓冲液胶电泳(电压4 V/cm)，溴化乙锭染色15 min，凝胶成像分析系统成像并测定各自的积分光密度值。

另取第3代OB，加入10^{-6} mol/L, genistein，分别于0,6,12和24 h提取总RNA，依上述方法，进行RT-PCR。

表1 OPG、RANKL和GAPHDH引物序列及扩增片段长度

名称	引物	扩增片段长度
OPG	上游引物(sense primer)： 5′-ACAGACTTTCCAGCTGCTGAAG-3 下游引物(antisense primer)： 5′-ATGGGATCTCGCCAATTGTG-3	435 bp
RANKL	上游引物(sense primer)： 5′-CCATCGGGTTCCCATAAAGTCAGT-3′ 下游引物(antisense primer)： 5′-AAAGCCCCAAAGTACGTCGCATCT-3′	407 bp
GAPDH	上游引物(sense primer)： 5′-CACTGACACGTTGGCAGTGG-3′ 下游引物(antisense primer)： 5′-CATGGAGAAGGCTGGGGCTC-3′P	377 bp

3. 统计学分析

结果以均值±标准差表示，所有数据采用SPSS 10.0软件的one way ANOVA方差分析，组间*q*检验，$P<0.05$为差异有显著性。

结 果

1. TRAP阳性细胞计数

细胞悬液与玻片共同培养3 d，玻片上即开始出现数目不等的TRAP阳性的细胞，这些细胞胞浆丰富，TRAP染色呈颗粒状酒红色着色，胞核数目不等，多为单核和双核，3核以上的破骨样细胞较少见，到第8天，各组TRAP阳性的多细胞数量达到最多。但不同浓度组之间随实验时间的推移，TRAP阳性破骨样细胞计数值基本呈递减趋势(图1)。

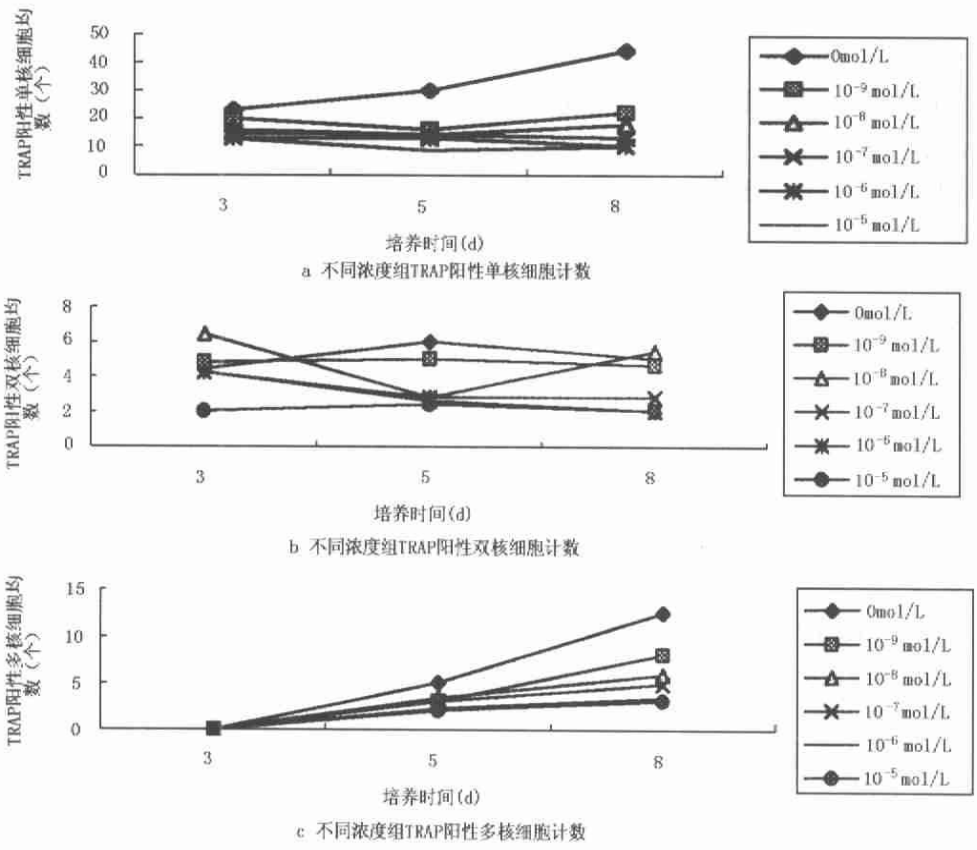

图1 不同浓度 genistein 对 $1,25(OH)_2D_3$ 诱导骨髓细胞形成 TRAP 阳性细胞个数的影响

2. 体外骨吸收陷窝面积

细胞悬液与骨磨片共同培养，各组骨吸收陷窝除 10^{-9}mol/L 组以外，其余各实验组与对照组相比，均有显著下降（$P<0.01$）。其中，10^{-9}mol/L 组与 10^{-8}mol/L、10^{-7}mol/L、10^{-6}mol/L、10^{-5}mol/L 组之间，10^{-8} mol/L、10^{-7} mol/L 组与 10^{-6} mol/L、10^{-5} mol/L之间差异均有显著性（表2）。

表2 各浓度 genistein 对破骨细胞骨吸收陷窝面积的影响（$\bar{x}\pm s$, $n=8$）

浓度(mol/L)	骨吸收陷窝面积(μm^2)
0	16969.50 ± 3538.36
10^{-9}	15133.63 ± 3960.98
10^{-8}	8080.38 ± 1022.01$^{**\triangle}$
10^{-7}	6243.50 ± 1202.14$^{**\triangle\triangle}$
10^{-6}	5703.50 ± 1249.86$^{**\triangle\triangle\#}$
10^{-5}	3052.63 ± 779.41$^{**\triangle\triangle\#\#\bigcirc\bigcirc\$}$

注：与 0 mol/L genistein 比较** $P<0.01$；与 10^{-9} mol/L genistein 比较，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$；与 10^{-8} mol/L genistein 比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与 10^{-7}mol/L genistein 比较，$^{\bigcirc\bigcirc}P<0.01$；与 10^{-6} mol/L genistein 比较，$^{\$\$}P<0.01$

3. 成骨细胞鉴定

体外培养成骨细胞呈梭形或纤维细胞状。原代培养细胞长满后，首次 1:2 传代，传代细胞生长较慢，到第3代细胞生长加快且稳定，可用于实验。碱性磷酸酶染色，可见 OB 呈强阳性，胞浆内出现棕黑色细小颗粒，在细胞密集处着色明显（图2）。

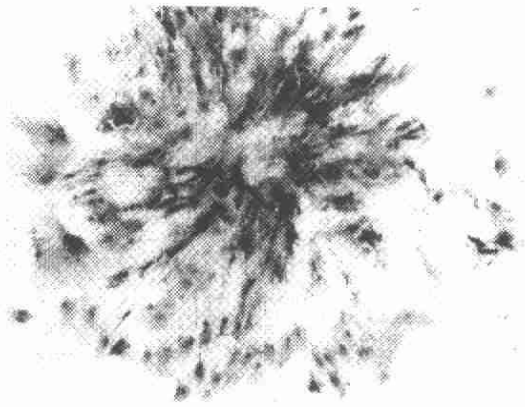

图2 成骨细胞碱性磷酸酶染色。成骨细胞胞浆阳性，可见棕黑色细小颗粒，在细胞密集处着色明显（光镜×20）

4. Genistein 对成骨细胞中 OPG 和 RANKL mRNA 表达的影响

电泳条带见图3,4。积分光密度结果见图5,6，在 $10^{-8}\sim10^{-5}$ mol/L 剂量范围内，应用各种浓度的 genistein，其 OPG 和 RANKL 的表达都有增强，最终在 $10^{-8}\sim10^{-6}$ mol/L 剂量范围内增大 OPG/RANKL 比值，呈正量效关系。从时间上看，在加入 10^{-6} mol/L

genistein 0 ~ 12 hOPG 和 RANKL 的比值时间依赖性地升高，24 h 后有下降。浓度 10^{-6} mol/L、作用时间 12 h 的效果最强。

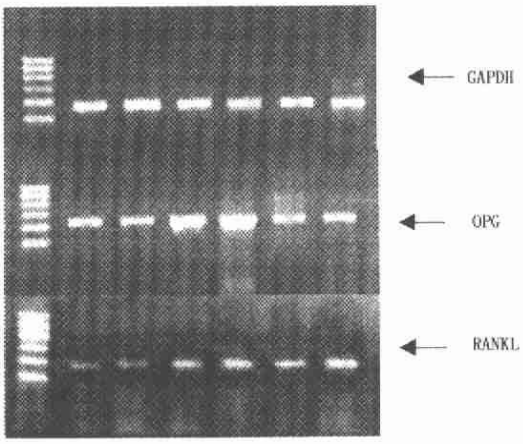

图 3 OB 经各浓度 genistein 作用 12 h 后 OPG 和 RANKL mRNA 表达的电泳图

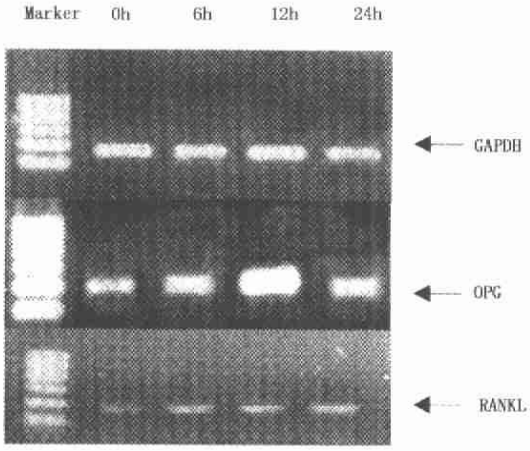

图 4 OB 经 10^{-6}mol/L genistein 作用后 OPG 和 RANKL mRAN 表达随时间变化的电泳图

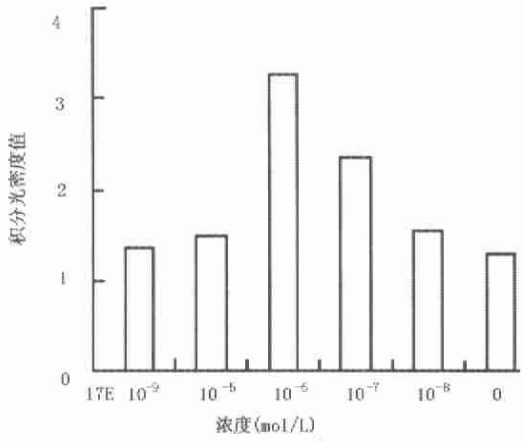

图 5 各浓度 genistein 对 OPG/RANKL mRNA 表达积分光密度比值的影响

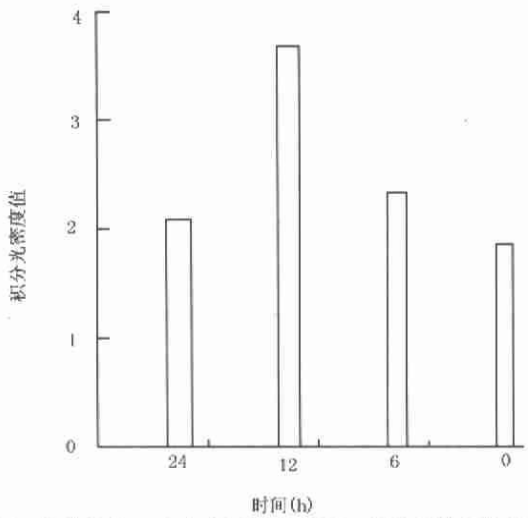

图 6 各时间点 genistein 对 OPG/RANKL mRAN 表达积分光密度比值的影响

讨 论

Genistein 是大豆异黄酮中的一种主要有效成分，从大豆豆粕中提取，其化学结构与 17β-雌二醇相似。20 世纪 50 年代，人们对异黄酮的雌激素活性发生了最初的兴趣。Gao 等[7,8]研究表明，异黄酮可直接通过抑制前破骨细胞的分化或抑制前破骨细胞对 PTH 的反应来抑制破骨细胞的吸收功能。本实验观察到在加入不同浓度的 genistein 后，$TRAP^+$ 单核、双核和多核的数量基本呈时间依赖性地递减趋势，表明 genistein 体外有抑制活性维生素 D_3 促破骨细胞分化的功能。此结果支持 Gao 等的研究结论。但 Gao 等没有检测 genistein 对破骨样细胞骨吸收功能的影响。本实验采用骨髓细胞与灭活骨片共培养的方法，通过测量骨吸收陷窝面积的变化，探讨了 genistein 对破骨样细胞骨吸收功能的作用。结果表明，骨吸收陷窝的面积呈剂量依赖性地递减，这种趋势与相应的 $TRAP^+$ 细胞个数的变化相一致。

骨保护因子(OPG)及其配体(OPG-L, ASBMR 宣称其为 RANKL[10])的发现为研究骨代谢的分子机制开辟了新的方向，二者在调控 OC 的生成、骨吸收和骨重建中，处于核心枢纽地位。多数学者的研究认为，许多亲骨性因子、激素及药物，发挥其对骨代谢的作用时，其效应最终全部或部分汇集到 OPG 和 RANKL 水平[10-12]。OPG 和 RANKL 的研究为探讨 genistein 抑制骨吸收的分子机制提供了新的思路。

目前，国外有关 genistein 对 OB 中 OPG 和 RANKL 表达影响的报道各有一篇，国内尚无报道。Yamagishi 等认为，将 genistein 预处理 ST2 细胞 6 h 后，再与脾细胞共培养，TRAP 阳性的 OLC 数目显著减少，ST2 细胞中 RANKL mRNA 水平下降，OPG 水平上升。

此表现与拓扑异构酶Ⅱ抑制 amsacrine 和 etoposide 的作用相同。因此,作者认为 genistein 通过抑制拓扑异构酶Ⅱ的活性来抑制破骨样细胞的形成[13]。半定量 RT-PCR、Northern 杂交和 ELISA 分析也显示[14],genistein 剂量和时间依赖性地提高原代人成骨细胞 OPG 的 mRNA 和蛋白水平 2~6 倍,其中最有效剂量为 10^{-7} mol/L;这种作用可被 ER 特异性拮抗剂 ICI182780 所抑制,提示其刺激 OPG 的表达与 ER 直接相关;同时,这种促进作用不受蛋白合成抑制剂放线菌酮的影响,说明 OPG 上调的效应与 OPG 基因转录有关。本实验通过半定量 RT-PCR 观察到,在 10^{-8}~10^{-5}mol/L 剂量范围内,应用各种浓度的 genistein,其 OPG 和 RANKL 的表达都有增强,最终在 10^{-8}~10^{-6}mol/L 剂量范围内增大 OPG/RANKL 比值,呈正量效关系。从时间上看,在加入 10^{-6} mol/L genistein 0~12 h,OPG 和 RANKL 的比值时间依赖性地升高,24 h 后有下降。浓度 10^{-6}mol/L、作用时间 12 h 的效果最强。这一结果从分子角度为 genistein 防治骨吸收的作用提供了依据,对 2 种因子蛋白表达的影响还需进一步研究。

参 考 文 献

1 Redlich K, Haryer S, Ricci R, et al. Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. J Clin Invest, 2002, 110: 1419-1427.

2 Alper G, Mark RP, Rajiv K. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1α, 25-dihydroxyvitamin b3: implications in cell growth and differentiation. Endocrine Reviews, 2002, 23: 763-786.

3 Agnusdei D, Adami S. Effects of ipriflavone on bone mass and calcium metabolism in post menopausal osteoporosis. Bone Miner, 1992, 19(s1): 43-48.

4 Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, et al. Interaction of estrogen chemicals and phytoestrogen with estrogen receptor beta. Endocrinology, 1998, 139: 4252-4263.

5 赵宁侠,于世凤. 空泡型质子泵阻断剂 Baf.A1 抑制破骨样细胞体外骨吸收研究. 中华病理学杂志, 1999, 28: 436-439.

6 李铁军,于世凤,王晓敏,等. 1,25(OH)$_2$D$_3$ 对小鼠骨髓细胞形成破骨细胞样细胞及其骨吸收效应的影响. 中国骨质疏松杂志, 2000, 6(3): 12-15.

7 Gao YH, Yamaguchi. Inhibitory effect of genistein on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures. Bioch Pharm, 1999, 58: 767-772.

8 Giossi M, Caruso P. Inhibition of parathyroid hormone-stimulated resorption in cultured fetal rat long bones by the main metabolites of ipriflavone. Calcif Tissue Int, 1996, 58: 419-422.

9 American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. Proposed standard nomenclature for new tumor necrosis factor family members involved in the regulation of bone resorption. The American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. J Bone Miner Res, 2000, 15: 2293-2296.

10 Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprogtegerin in human osteoblastic cells. Endocrionology, 1999, 140: 4367-4370.

11 Brandstrom H, Jonsson KB, Ohlsson C, et al. Regulation of osteoprotegerin mRNA levels by prostaglandin E2 in human bone marrow stroma cells. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 247: 338-341.

12 Takai h, Kanematsu M, Yano K, et al. Transforming growth factor-β stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. J Bio Chem, 1998, 273: 27091-27096.

13 Yamagishi T, Otsuka E, Hagiwara H. Reciprocal control of expression of mRNAs for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal cells by genistein: evidence for the involvement of topoisomerase Ⅱ in osteoclastogenesis. Endocrinology, 2001, 142: 3632-3637.

14 Viereck V, Dker CG, Blaschke S, et al. Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts. J Cell Biochem, 2002, 84: 725-735.

(收稿日期:2004-03-30)

(上接第266页)

6 刘宗礼,李贺达,杨学琪,等. 自体骨髓加入工陶瓷复合移植成骨作用的实验评价. 天津医药, 2000, 28: 229-231.

7 D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, et al. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stemcells from human vertebral bone marrow. J Bone Miner Res, 1999, 14: 1115-1122.

8 Chen JL, Hunt P, McElvain M, et al. Osteoblast precursor cells are found in CD34+ cells from human bonemarrow. Stem Cells, 1997, 15: 368-377.

9 Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, et al. Repair of large bone defects with the use of autologousbone marrow stromal cells. N Engl J Med, 2001, 344: 385-386.

10 Noth U, Osyczka AM, Tuli R, et al. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecularbone-derived cells. J Orthop Res, 2002, 20: 1060-1069.

11 Bellows CG, Heersche JN. The frequency of common progenitors for adipocytes and osteoblasts and of committed and restricted adipocyte and osteoblast progenitors in fetal rat calvaria cell populations. J Bone Miner Res, 2001, 16: 1983-1993.

12 Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 10711-10716.

13 Ducy P, Schinke T, Karsenty C. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. Science, 2000, 289: 1501-1504.

14 孙世荃. 同种异体骨的制备方法及其成骨效果. 中华外科杂志, 1996, 43: 473.

15 Urist MR, Dawson E. Inertransverse process fusion with the aid of chemosterilized autolyzed antigen-extracted allogeneic (AAA) bone. Clin Orthop, 1981, 154: 97-113.

16 许永华,旋新猷,胡蕴玉,等. 胶原-煅烧骨支架与成骨细胞相容性实验研究. 中国临床解剖学杂志, 2000, 18: 358-359.

(收稿日期:2004-02-26)