

成人成骨细胞和 MG-63 细胞株孕激素受体的表达

梁敏 廖二元

【摘要】 目的 观察成人成骨细胞和 MG-63 细胞株孕激素受体(progesterone receptor, PR)亚型表达的情况。方法 用改良胶原酶消化法从正常成人松质骨中分离成骨细胞,观察细胞形态,钙钴法行碱性磷酸酶染色, Van Gieson 法行 I 型胶原染色,茜素红行矿化结节染色;半定量 RT-PCR 检测骨钙素和 PR 亚型 mRNA 表达; Western blot 测定 PR 蛋白质表达。结果 所分离培养的细胞具有成骨细胞的形态特征,保持了其在体内的功能;人成骨细胞和 MG-63 细胞株均表达 PRA、PRB mRNA 和蛋白质。结论 人成骨细胞和 MG-63 细胞株可能受孕激素的影响。

【关键词】 人成骨细胞; MG-63 细胞株; 鉴定; 孕激素受体

Expression of progesterone receptors in human normal osteoblasts and MG-63 cells LIANG Min and LIAO Er' yuan. Institute of Metabolism and Endocrinology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China

【Abstract】 Objective To observe the expression of progesterone receptors in human osteoblasts and human osteosarcoma cell line MG-63. **Methods** The human osteoblasts were isolated from the trabecular bone by collagenase digestion. The expression of alkaline phosphatase, collagen type I, mineralized nodes and osteocalcin were studied with modified Gonori's assay, van Gieson's staining, alizarin red-S staining and RT-PCR, separately. The expression of PRA and PRB mRNA and protein was measured by RT-PCR and Western blot in human osteoblasts and MG-63 cells. **Results** The isolated normal human osteoblasts possessed the phenotypes and functions of osteoblasts *in vivo*. PRA and PRB mRNA and protein were expressed in both human osteoblasts and MG-63 cells. **Conclusions** Human osteoblasts and MG-63 cells are the target cells of progesterone through its receptors.

【Key words】 Human osteoblasts; MG-63 cells; Identification; Progesterone receptors

最近的研究表明孕激素不仅可以防止激素补充治疗中雌激素引起子宫内膜增生和子宫内膜癌的副作用,而且对骨质疏松症也有直接的治疗作用,可减少绝经后妇女的骨吸收,增加骨形成^[1-3]。孕激素的效应主要通过孕激素受体(Progesterone receptor, PR)调节,目前在成骨细胞上发现了 PR^[4,5],表明孕激素可直接作用于成骨细胞。为了探讨孕激素对成骨细胞的作用机制与途径,我们首先从正常成人松质骨中分离成骨细胞,并进行功能鉴定,然后观察了正常成人成骨细胞中 PR 亚型表达的情况,并与具成骨细胞表型特征的人成骨肉瘤 MG63 细胞株进行比较。

材料和方法

1. 细胞培养

正常人成骨细胞的培养:外科手术取正常成人(30~50 岁无骨代谢疾病的骨折患者)松质骨(髂骨、股骨头)1~2 g 剪成 2 mm³ 大小碎粒,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗摇荡 3 次,加入 1 mg/ml IV 型胶原酶震荡消化(37℃),待松质骨变白并呈蜂窝状,加入含 20% 胎牛血清(FBS)的 MEM 终止消化,再用含 10% FBS 的 MEM 洗涤 3 次,待洗液中不含细胞时,将骨片贴于 75 cm² 培养瓶,加入含 15% FBS 的 MEM 培养液,37℃、饱和湿度、5% CO₂ 环境下培养。2 d 后换液去除血细胞,以后每 3d 换液 1 次,待细胞长满后用 0.25% 胰酶-EDTA 消化液消化,再接种到 25cm² 培养瓶,调整细胞数为 5 × 10⁵ 个/瓶。

人成骨肉瘤 MG63 细胞株购自美国培养物保存

作者单位:410011 长沙,中南大学湘雅二医院代谢内分泌研究所

通讯作者:廖二元 E-mail:eyliao 2003@21cn.com

中心[(ATCC 号: CLR-1427)第 98 代]用含 10% FBS 无酚红的 MEM 培养液培养, 每 3 d 换液 1 次, 细胞汇片后用 0.25% 胰酶-EDTA 消化液消化, 按 5×10^5 个细胞/瓶接种至 25 cm^2 培养瓶。

2. 人成骨细胞功能鉴定

人成骨细胞汇片后, 用 0.25% 胰酶-EDTA 消化液消化, 以 $3 \times 10^5/\text{ml}$ 密度接种于 6 孔板中, 每隔 2d 用含 15% FBS 的 MEM 培养液换液。用于观察矿化结节形成的细胞, 于接种后第 6d 开始, 每次换液时, 在上述 MEM 培养液中另加入 10 mmol/L β -甘油磷酸钠(β -sodium glycerophosphate)。

(1)碱性磷酸酶染色: 细胞固定后入孵育液(0.5% β -甘油磷酸钠、0.5% 巴比妥钠、0.9% 氯化钙、0.04% 硫酸镁), 于 37°C 孵育 6 h, 2% 硝酸钴作用 5 min, 1% 硫化胺处理 1 min, 乙醇脱水, 镜下观察并摄像。另设阴性对照, 孵育液中不含 β -甘油磷酸钠。

(2)I 型胶原染色: 细胞用 PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 10 min, Weigert 铁苏木素染液染色 5 min, Van Gieson 苦味酸酸性复红染液染色 5 min, 95% 乙醇快速分化、脱水, 倒置显微镜下观察并摄像。

(3)矿化结节染色: 细胞固定后, 用 0.1 茜素红(alizarin red-S)染色 5 min 蒸馏水洗 3 次, 乙醇脱水, 镜下观察并摄像。

(4)骨钙素(osteocalcin, BGP)检测: 用 RT-PCR 法检测 BGP 基因的表达。

3. 细胞总 RNA 的抽提和半定量 RT-PCR 测定 PR、BGP mRNA 表达

用 Trizol 抽提细胞总 RNA, 取 $2.0 \mu\text{g}$ 总 RNA 用逆转录试剂盒合成 cDNA。根据 PR 的 cDNA 序列^[6], 设计并合成两对引物: PRB 特异 cDNA 区域的引物序列, 扩增片段长度 308 bp; PRA 和 PRB 共同 cDNA 区域的引物序列, 扩增片段长度 459 bp。引物序列见表 1。加入相应引物扩增 PR、BGP 和 β -actin 基因, 其中目的基因引物和 β -actin 引物放入同一 PCR 管中进行扩增。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭染色显影并拍照。

4. 细胞总蛋白的提取和 Western Blot 检测 PR 蛋白质的表达

用 Trizol 提取细胞总蛋白, Bradford 法测定细胞总蛋白含量。取 $60 \mu\text{g}$ 细胞总蛋白溶液与 $4 \times \text{SDS}$ 加样缓冲混匀, 99°C 加热使蛋白变性 5 min, 点样于 7.5% SDS-PAGE 胶中电泳, 再电转移至硝酸纤维素膜。硝酸纤维素膜用含 5% 脱脂牛奶的 PBS 封闭 1 h, 用兔抗人 PR-抗(1:300 稀释)杂交膜 3 h, PBS(含

0.1% Tween20)洗膜 3 次, 再用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:1000 稀释)杂交膜 1 h, PBS 洗膜 3 次。显色: 取 6 mg 二氨基联苯胺(DAB)溶于 10 ml 0.05mol/L TBS(pH7.6)中, 加 $10 \mu\text{l}$ 过氧化氢, 过滤; 退火硝酸纤维素膜, 3~5 min 可见条带, 用蒸馏水冲洗, 终止反应, 照相。

表 1 各基因引物序列及扩增产物长度

基因	引物序列 5'→3'	产物长度(bp)
PRB	正向: CATGACTGAGCTGAAGGCAA	308
	反向: GACTAGAACTGCTGCCTCCA	
PRA 和 PRB 共同序列	正向: GCATCAGGCTGTCATTATGG	459
	反向: AAGTTGCCTCTCGCCTAGTT	
BGP	正向: GGGCAGCGAGGTAGTAG	256
	反向: CAAGGGGAAGAGGAAAGAAGG	
β -actin	正向: CCTCGCCTTTGCCGATCC	620
	反向: GGATCTTCATGAGGTAGTCACTC	

结 果

1. 人成骨细胞鉴定

(1)细胞形态: 在倒置相差显微镜下细胞呈纺锤形、多边形和类梭形、核圆形, 符合成骨细胞的形态特征。

(2)碱性磷酸酶: 用改良钙钴法染色, 可见培养的人成骨细胞胞浆内有棕黑色的微粒, 阴性对照的细胞内无棕黑色微粒。

(3)I 型胶原染色: 人成骨细胞在体外培养第 20d 时, 细胞生长致密, 合成大量 I 型胶原, 形成胶原结节, Van Gieson 染色呈红棕色, 说明细胞具有合成基质蛋白的功能。

(4)矿化结节染色: 人成骨细胞在抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠存在条件下, 可使细胞外基质矿化, 形成多量矿化结节, 茜素红染色呈红色。

(5)BGP 的表达: RT-PCR 法显示正常人成骨细胞表达 BGP mRNA, 进一步证实了我们分离的细胞具有成骨细胞特征。

2. 正常成人成骨细胞和人成骨肉瘤 MG63 细胞株中 PR 亚型的检测

RT-PCR 和 Western blot 结果表明, 正常成人成骨细胞和 MG63 细胞株中均有 PRA 和 PRB 亚型的表达, 但表达丰度低(图 1, 2)。

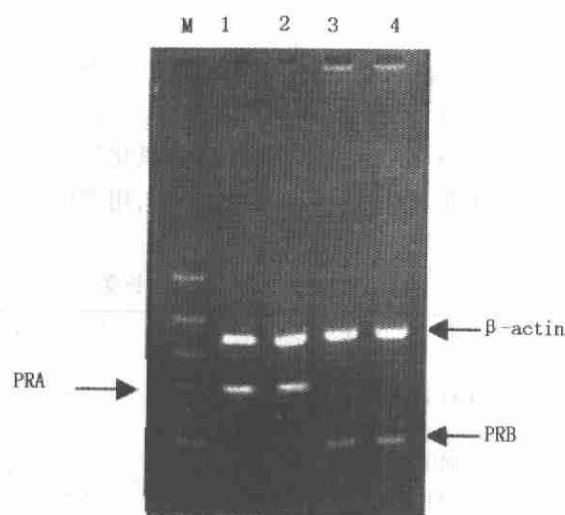


图1 MG63 细胞和人成骨细胞 PRA 和 PRB mRNA 的表达。M 为分子量标准,1,3 代表 MG63 细胞;2,4 代表人成骨细胞

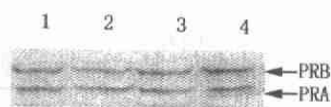


图2 MG63 细胞和人成骨细胞 PRA 和 PRB 蛋白质的表达。1,2 代表 MG63 细胞;3,4 代表人成骨细胞

讨论

本研究中我们取材成人髌骨和股骨头的松质骨,采用胶原消化法获得成人成骨细胞并进行了鉴定。I 型胶原、碱性磷酸酶、骨钙素的合成是成骨细胞的表型特征^[7],我们分别进行了 I 型胶原、碱性磷酸酶和矿化结染色及骨钙素基因的检测,提示所分离的细胞能分泌以上物质,并最终形成矿化结节。表明获得的人成骨细胞活性和功能良好,能够满足进一步研究的需要。

PR 基因定位于 11 号染色体长臂 1 区 3 带 (11q13)^[8]。PR 含有 2 个不同亚基 PRA 和 PRB, PRA 分子量为 94kDa, PRB 为 116kDa, 两亚基之间存在结构和功能上差异,其分布及比例对孕激素靶器官的生理、病理变化产生不同影响。孕激素能与 PR 的 C-端结合,在转录水平上调节基因的表达。PR 可用放射配体法^[9]、免疫法^[10]和细胞免疫组化^[5]等方法检测。由于 PR 在成骨细胞中的表达量很低,上述方法有时也不能检测出来,给 PR 的研究带来困难。RNA 的定量分析是研究基因表达和基因活性调控机制的重要途径。Northern 印迹法常被用于 RNA 水平的分析,但 Northern 分析需要的 RNA 量较大,而且对低丰度的 mRNA 的定量检测不太灵敏。S1 核酸酶

分析、RNase A 保护以及原位杂交等方法虽较 Northern 印迹法灵敏和易于定量,但这些方法都比较费时,技术难度大,而且难以应用于大批量的分析。因而在实际应用中,例如对低丰度的转录产物或少量细胞进行分析时,仍无法使用这些方法。RT-PCR 是将 mRNA 经逆转录后再用 PCR 特异性地扩增出该 mRNA 的序列,使对低丰度 mRNA 的检测成为可能,提高了 RNA 检测的敏感性(较 Northern 印迹法敏感 $3 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3$ 倍)。我们以看家基因 β -actin 为内对照进行半定量 RT-PCR,且 β -actin 和 PR 的 mRNA 一起逆转录并同管 PCR 扩增,可减少如 cDNA 的量、可扩增性和不同反应管间扩增效率等造成的差异。通过比较可对 PR mRNA 进行半定量。同时还可利用 Western blot 方法对 PR 蛋白质水平进行了分析。Western blot 是在蛋白质凝胶电泳和固相免疫测定的基础上发展起来的,它结合了凝胶电泳分辨力高和固相免疫测定特异敏感等优点,可从混杂抗原中检测出特定抗原,还可对转移到固相膜上的蛋白质进行连续分析,具有蛋白质反应均一性和敏感性高等特点,它检测蛋白质的敏感性为 1~5 ng。

我们用半定量 RT-PCR 和 Western blot 方法发现正常成人成骨细胞和人成骨肉瘤 MG63 细胞株中均有 PRA、PRB mRNA 和蛋白质的表达,但基础表达量低,与 Mac Namara 等^[4]和 Wei 等^[9]对人原代培养的成骨细胞和成骨样细胞株的结果一致。这也再次证实了孕激素可直接作用于成骨细胞。同时也表明人成骨肉瘤 MG63 细胞株可作为人成骨细胞的模型来研究成骨细胞的特性和所表达基因的调控,进行孕激素对成骨细胞作用机制的研究。

综上所述,我们用胶原酶消化法从正常成人骨组织中获得成骨细胞,并成功进行了体外培养,经鉴定体外培养的成骨细胞保持了其在体内的功能;证实人成骨细胞和 MG63 细胞株均表达 PRA、PRB mRNA 的蛋白质,为孕激素调节成骨细胞提供了直接证据。雌孕激素对 PR 的表达均有调控作用^[11,12],孕激素对人成骨细胞和人成骨肉瘤 MG63 细胞株 PR 表达的影响将另文报道。

参考文献

- Gallagher JC, Kable WT, Goldgar D. Effect of progestin therapy on cortical and trabecular bone: comparison with estrogen. *Am J Med*, 1991, 90 (2): 171-178.
- McNeeley SG, Jr Schinfeld JS, Stovall TG, et al. Prevention of osteoporosis by medroxyprogesterone acetate in postmenopausal women. *Int J*

PTH 介导的 MT1-MMP 表达减低反应。这表明 PTH 通过 PKA、PKC 信号转导途径调控成骨细胞 MT1-MMP 表达。

本研究观察到, PTH (1-34) 对 MG-63 细胞 proMMP-2 激活无影响, 可能为其他的膜蛋白, 如 MT2-MMP、MT3-MMP 等, 在 MMP-2 酶原激活中起重要作用^[2,3,6]。

成骨细胞分泌的 MMPs 被认为通过降解骨基质促进骨吸收, 以前的研究表明 PTH 可通过诱导成骨细胞 MMP-13 表达促进骨吸收^[7]。然而我们的研究表明 PTH(1-34) 抑制 MG-63 细胞 MT1-MMP 表达, 我们进一步发现 PTH(1-34) 诱导 MG-63 细胞 RANKL mRNA 表达呈剂量依赖性、时限性, 而且这种对 RANKL 的诱导效应与对 MT1-MMP 的抑制效应平行, 这表明了 MT1-MMP 与 RANKL 表达之间的一定联系。

最近的研究表明, MT1-MMP 膜蛋白可通过胞内区激动 ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) 信号通路, 启动细胞迁移与基因表达^[8,9]。这表明 MT1-MMP 的功能不仅仅局限于降解骨基质, 它还可以作为一个细胞膜上的受体蛋白激发细胞内信号转导。我们的研究发现 PTH 对成骨细胞 RANKL 的诱导效应与对 MT1-MMP 的抑制效应平行, 这表明了 MT1-MMP 与 RANKL 表达之间的一定联系。RANKL 是由成骨细胞表达的刺激前体破骨细胞分化和活化的促骨吸收信号蛋白^[1]。由于 MT1-MMP 可激动细胞内 ERK 信号通路, 而研究表明 ERK 信号激动可抑制成骨细胞 RANKL 表达, 我们认为 PTH 可通过抑制成骨细胞 MT1-MMP 表达, 进入 RANKL 信

号通路, 促进骨吸收。

参 考 文 献

- Li W, Farach-Carson MC. Parathyroid hormone-stimulated resorption in calvaria cultured in serum-free medium is enhanced by the calcium-mobilizing activity of 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Bone*, 2001, 29:231-235.
- Luo XH, Liao EY. Progesterone differentially regulates the membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) compartment of proMMP-2 activation in MG-63 cells. *Horm Metab Res*, 2001, 33:383-388.
- Liao EY, Luo XH, Deng XG, et al. Effects of 17 β -estradiol on the expression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in human osteoblastic MG-63 cell cultures. *J Endocrinol Invest*, 2001, 24:876-881.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TM. *Molecular Cloning Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 888-897.
- Rifas L, Fausto A, Scott MJ, et al. Expression of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human osteoblast-like cells: differentiation is associated with repression of metalloproteinase biosynthesis. *Endocrinology*, 1994, 134:213-221.
- Lohi J, Lehti K, Westermarck J, et al. Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression by growth factors and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Eur J Biochem* 1996, 239:239-247.
- Uchida M, Yamato H, Nagai Y, et al. Parathyroid hormone increases the expression level of matrix metalloproteinase-13 *in vivo*. *J Bone Miner Metab*, 2001, 19:207-212.
- Gingras D, Bousquet-Gagnon N, Langlois S, et al. Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Febs Lett*, 2001, 507:231-236.
- Annabi B, Lachambre M, Bousquet-Gagnon N, et al. Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains. *Biochem J*, 2001, 353:547-553.
- (收稿日期:2003-11-06)
- (上接第 414 页) *Gynaecol Obstet*, 1991, 34(3): 253-256.
- Yamamoto Y, Kurabayashi T, Tojo Y, et al. Effects of progestins on the metabolism of cancellous bone in aged oophorectomized rats. *Bone*, 1998, 22(5):533-537.
- Mac Namara P, Loughrey HC. Progesterone receptor A and B isoform expression in human osteoblasts. *Calcif Tissue Int*, 1998, 63(1): 39-46.
- MacNamara P, O'Shaughnessy C, Manduca P, et al. Progesterone receptors are expressed in human osteoblast-like cell lines and in primary human osteoblast cultures. *Calcif Tissue Int*, 1995, 57(6): 436-441.
- Kastner P, Krust A, Turcotte B, et al. Two distinct estrogen regulated promotes genomic transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *E MBO J*, 1990, 9(5): 1603-1614.
- Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev*, 1993, 14:424-442.
- Horwitz KB, Tung L, Takimoto GS. Novel mechanisms of antiprogesterin action. *Acta Oncol*, 1996, 35(2): 129-140.
- Wei LL, Leach MW, Miner RS, et al. Evidence for progesterone receptors in human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993 (2), 195:525-532.
- Wei LL, Norris BM, Baker CJ. An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C) forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)-DNA binding. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1997, 62 (4): 287-297.
- Tibbetts TA, Mendoza Meneses M, O'Malley BW, et al. Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptors expression in the mouse uterus. *Biol Reprod*, 1998, 59(5): 1143-1152.
- Gunnet JW, Granger K, Cryan E, et al. Characterization of the progesterone receptors in the human TE85 and murine MC3T3-E1 osteoblast-like lines. *J Endocrinol*, 1999, 163(1): 139-147.
- (收稿日期:2003-12-20)