

瘦素对成骨细胞骨保护蛋白 mRNA 表达的影响初探

李晓佳 魏松全 李双庆 安振梅 杨元

【摘要】 目的 初步探讨瘦素(Leptin)对成骨细胞骨保护蛋白(OPG)mRNA 表达的影响。方法 用 SYBR Green I 染料实时监测定量 RT-PCR 的方法测定骨保护蛋白(OPG) mRNA 表达。结果 瘦素(Leptin)使成骨细胞骨保护蛋白 OPG mRNA 表达呈剂量和时间依赖性降低。结论 瘦素(Leptin)作为一种内分泌因子,可直接与成骨细胞上 leptin 受体特异结合,通过受体后信号转导下调节成骨细胞 OPG mRNA 表达,使 OPG mRNA 表达降低,和其它因子共同参与骨重建调节。

【关键词】 瘦素;成骨细胞;骨保护蛋白

Regulation of osteoprotegerin mRNA levels by leptin in human osteoblast-like cells LI Xiaojia, WEI Songquan, LI Shuangqing, et al. Department of Neurology, Sichuan People's Hospital, Chengdu 610073, China

【Abstract】 Objective To study the effect of leptin on the expression of osteoprotegerin (OPG) mRNA in osteoblast-like cells. **Methods** The expression of OPG mRNA in osteoblast-like cells was determined by real-time quantitative RT-PCR based on Light Cycler technology. **Results** Leptin down-regulated the mRNA levels of OPG ($P < 0.05$) in a dose- and time-dependent manner. **Conclusions** Leptin acts directly on osteoblasts to regulate bone remodelling by decreasing OPG mRNA.

【Key words】 Leptin; Osteoblasts; Osteoprotegerin

瘦素(leptin)参与了骨代谢,并介导了骨量、体重和生殖三者之间的关系,许多研究已发现 leptin 在骨代谢中发挥重要的调节作用^[1],然而 leptin 在骨重建中的作用是非常复杂和充满争议的。骨保护蛋白(Osteoprotegerin, OPG)和破骨细胞分化因子(ODF)的发现^[2,5],让我们从新的角度去探讨 leptin 在骨重建中的作用。OPG 被认为在骨重建过程中起关键作用,许多因子均部分或完全地通过调节 OPG 生成来发挥其间接调节破骨细胞分化及骨重建的作用,OPG 生成增加,破骨细胞数目减少、骨吸收功能减弱,反之,破骨细胞数目增加、骨吸收增强。目前倾向于认为 OPG 体现了破骨细胞分化功能状态,OPG 表达增多,OC 数量增加、功能增强,反之亦然。ODF:OPG mRNA 的比值直接影响骨重建方向,比值增加,ODF 促进破骨细胞形成、活化占优势,骨吸收强于骨形成^[6]。

本文作者拟通过探讨 leptin 对体外培养成骨细

胞 OPG mRNA 表达的影响来研究 leptin 在成骨细胞之间、之后对骨吸收的作用,希望能通过此实验进一步明确 leptin 在骨重建中的作用,并为以后的研究提出新的假设和方向。

材料和方法

1. 细胞制备

将新鲜鉴定后的传三代成骨细胞(四川大学移植免疫实验室提供)接种于 T-25 培养瓶,共 15 瓶;待细胞长满后,吸出培养基,用 PBS 清洗 2 次,加入不含 NBS 之 DMEM 培养液,分成 5 组,1 组 3 瓶;每组分别加入不同浓度瘦素,使瘦素终浓度分别达 0、20、40、80、160 ng/ml;培养 3 d,予提取细胞总 RNA(量效)。同样方法接种 9 瓶,均加入终浓度为 10 ng/ml 的瘦素,于第 1、3、6 d 分别提取 3 份标本细胞总 RNA(时效)。

2. 方法

(1)细胞总 RNA 提取(TRIZOL)。

(2)SYBR Green I 模式定量 RT-PCR^①引物^[7]:上游:5'-AAC CCC AGA GCG AAA TAC-3';下游:5'-

作者单位:610073 成都,四川省人民医院神经内科(李晓佳);四川大学华西医院内分泌科(魏松全、李双庆、安振梅);四川大学华西医院遗传研究室(杨元)

AAG AAT GCC TCC TCA CAC-3' ②操作按 RT-PCR 试剂盒说明书并作调整:反应体系为 25 μ l, 含有 2 μ l dNTP, 0.5 μ g RNA 模板, 0.5 μ l 酶复合物, 0.05 mmol 引物, 2 μ l SYBR Green I, 将各种样品转入毛细管, 瞬时离心, 并放入 Light Cycler 仪。③反应程序: 50 $^{\circ}$ C, 30 min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C, 3 min \rightarrow 90 $^{\circ}$ C, 30 秒 \rightarrow 57 $^{\circ}$ C, 30 s \rightarrow 6 $^{\circ}$ C, 30 s(45 个循环) \rightarrow 68 $^{\circ}$ C, 30 s \rightarrow 4 $^{\circ}$ C 保存。④分析样本: 定量软件对 RT-PCR 产物作实时定量分析(相对拷贝数)和熔点曲线分析^[8,9]。Light Cycler 定量软件侧重于分析 PCR 扩增过程中产物呈指数增长长期的荧光值变化。用已知浓度等梯度稀释的标准品和待测模板一起共扩增, 进行直线转换, 由标准品拷贝数及其交叉点数值确定出标准曲线, 在标准曲线上比较不同待测样本交叉点数值, 即可获得其起始浓度的对数值, 再转换为精确拷贝数。

3. 统计学处理

结果以样本均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, SPSS10.0 统计软件进行方差分析。

结 果

1. 熔点曲线分析

从图 1 可见一个主峰, T_m 值波动在 82.41 ~ 83.04 $^{\circ}$ C, 说明产物特异性较好。

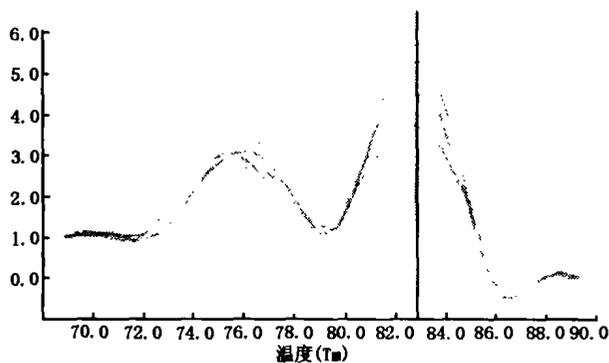


图 1 熔点曲线

2. OPG mRNA 表达拷贝数

(1)浓度 leptin 作用于成骨细胞后, OPG mRNA 表达拷贝数见表 1, 20、40、80、160ng/ml 瘦素组与对照组(0 ng/ml)比较均有统计学差异($P = 0.01$); 40、80、160 ng/ml 瘦素组与 20 ng/ml 瘦素组比较均有统计学差异($P = 0.02$); 40 ng/ml 瘦素组与 80 ng/ml 瘦素组之间($P = 0.075$), 80 ng/ml 瘦素组与 160 ng/ml 瘦素组之间无明显差异($P = 0.064$), 但是呈减少趋势。

表 1 不同浓度 Leptin 作用后 OPG mRNA 表达拷贝数

Leptin(ng/ml)	第 3d OPG mRNA 表达量
0	(4.2055 \pm 0.1619) 10^6
20	(1.1845 \pm 0.064) $\times 10^6$ *
40	(1.8075 \pm 0.067) $\times 10^5$ **
80	(6.5785 \pm 0.0784) $\times 10^4$ **
160	(8.675 \pm 0.106) $\times 10^3$ **

注:与其他各组比较,* $P = 0.01 < 0.05$;与 0, 20, 40 (ng/ml) 组比较,** $P = 0.02 < 0.05$

(2)Leptin 作用不同时间后 OPG mRNA 表达拷贝数见表 2, 作用 1、3 d 瘦素组与作用 6 d 瘦素组比较有统计学差异(分别 $P = 0.02$, $P = 0.023$); 而作用 1 d 瘦素组与作用 3 d 瘦素组之间无明显差异, 呈减少趋势。

表 2 Leptin 作用不同时间后 OPG mRNA 表达拷贝数

时间(d)	OPG mRNA 表达量
1	(2.447 \pm 0.132) $\times 10^6$ *
3	(2.247 \pm 0.165) $\times 10^6$ *
6	(1.175 \pm 0.0778) $\times 10^5$

注:与其他各组比较,* $P = 0.02 < 0.05$;与第 6 d 比较,** $P = 0.023 < 0.05$

讨 论

本实验观察用不同生理浓度 leptin 作用成骨细胞和作用不同时间后对成骨细胞 OPG mRNA 表达的影响, 结果显示, 随着瘦素浓度增加, OPG mRNA 表达逐渐减小, 而作用 1、3 d, OPG mRNA 表达差别虽无统计学差异, 但 6 d 较 1、3 d 表达有下降, 可见随着作用时间延长仍有下降的趋势, 瘦素使成骨细胞骨保护蛋白(OPG) mRNA 表达呈剂量和时间依赖性降低。上述结果提示 leptin 能调节成骨细胞 OPG mRNA 表达, 使 OPG mRNA 表达降低, OPG 生成减少, 促进骨吸收, 参与骨重建调节。

已有研究表明肥胖对骨量的保护作用常常归结于与血清 leptin 水平相关的高体脂量^[10], Matkovic^[11]对 343 例青春女性 4 y 的研究表明, leptin 与骨面积及骨面积变化正相关, 认为 leptin 通过作用于骨膜影响骨量; Thomas^[12]评价了人重组 leptin 对人类条件性永生骨髓基质细胞系—HMS2-12 的作用, 结果表明 leptin 可作用于人骨髓基质细胞提高其向成骨细胞分化, 抑制其转化为脂肪细胞。体外实验提示, 生理浓度的 leptin 还能提高体外培养的新生鼠颅骨细胞矿化骨小结的数目^[13]。另外一项研究发现 leptin 可增加肥胖 ob/ob 鼠骨的内皮质形成^[11]。Jan

等^[15]用 RT-PCR 方法证实 leptin 可增加 TGF- β 、IGF-1、I 型胶原、ALP、骨钙素的表达。另外, Gordanland^[16]发现用 leptin 长时间孵育成骨细胞可致矿化, leptin 还被证明是一种抗骨髓基质细胞和成骨细胞凋亡的因子, 促进成骨细胞向骨细胞转化, leptin 长时间作用后, 成骨细胞标志基因 OSF-2 减少而骨细胞标志基因 CD44 增加^[15]。Steppan^[17]给 4 w 龄缺失 leptin ob/Ob 鼠腹腔内注射 leptin ($50 \mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 3 w 后, 小鼠股骨骨皮质、骨小梁骨矿含量均增加(外周 QCT 测定), 股骨增长, leptin 逆转了 ob/Ob 鼠骨生长缺陷和骨量降低; 有 Western 斑点杂交技术探测到软骨细胞和成骨细胞上有 leptin 受体表达, 推测 leptin 一方面可直接作用于其受体参与软骨骨化以及骨生长, 同时还影响了其它几种调节骨代谢激素, 如 LGF-1、糖皮质激素、生长激素水平来间接调节骨重建和骨生长。这一系列的研究均提示 leptin 在骨生长和骨重建过程中有重要的调节作用, 推测能促进骨形成。本实验结论揭示 leptin 可能对骨代谢起双向调节作用。

一个有趣的现象是 leptin 和 IL-6 均通过 gp130 信号转导途径刺激 JAK-STAT 激酶级联磷酸化将信号经细胞质转导至核内^[18]。IL-6 一方面能促进成骨细胞分化和活化, 促进骨形成, IL-6 和 IL-6R 或 IL-1 一起还能作用于胚胎成纤维细胞促进向成骨细胞呈递, 而不影响其向脂肪细胞、软骨细胞、肌细胞分化; 另一方面 IL-6 可介导破骨细胞分化、活化过程, 促进骨吸收。而在雌激素、雄激素撤退时 IL-6 受体上调, 靶细胞对 IL-6 敏感性增强, IL-6 促进破骨细胞分化、活化作用占优势, 骨吸收增强至骨质疏松^[19], 可见, leptin 和 IL-6 在信号转导和骨重建调节方面有相似之处, 但又不完全一样。

关于 leptin 调节成人成骨细胞 OPG mRNA 的途径, 我们在证实成人成骨细胞上有 leptin 长、短受体 mRNA 共表达的基础上用受体放射结合实验探讨了成骨细胞上 OB-R 的生物学特性。结果表明, 本实验培养之成骨细胞与¹²⁵I-Leptin 的结合具有高亲和、可逆及可饱和的配基-受体结合特性, 从而证实了成骨细胞存在 leptin 受体蛋白的表达并且能特异性地结合 leptin。因此我们推测, leptin 能与成骨细胞上 OB-R 结合, 直接与成骨细胞上 leptin 受体特异结合, 以内分泌、自分泌和旁分泌形式通过受体后信号转导调节成骨细胞功能, 和其它因子共同参与骨重建调节。

我们推测 leptin 在骨重建过程可能既促进骨

形成又能加速骨吸收, 但是我们目前尚未作出 leptin 对破骨细胞分化因子(ODF)mRNA 表达的影响, 暂时不能得到 ODF:OPG mRNA 比值的数据, 因此关于骨重建方向以及 leptin 对骨量的最终影响还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Patricia D, Thorsten S, Gerard K. The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 2000, 289:1501-1504.
- 2 Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone*, 1999, 25: 109-113.
- 3 Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblast that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 234:137-142.
- 4 Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprogenin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89: 309-319.
- 5 Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, et al. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2 and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 250:776-781.
- 6 Atkins GJ, Haynes DR, Grery SM, et al. Coordinated cytokine expression by stromal and hematopoietic cells during human osteoclast formation. *Bone*, 2000, 26: 653-661.
- 7 Bradstrom H, Jonson 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.
- 8 Simpson DA, Feeney S, Boyle C, et al. Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Mol Vis*, 2000, 6: 178-183.
- 9 Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, et al. Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J Mol Diagn*, 2001, 3:26-31.
- 10 Klein S, Coppack SW, Mohamed-Ali V, et al. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes*, 1996, 45: 984-987.
- 11 Matkovic V, Ilich JZ, Shugor M, et al. Leptin is inversely related to age at menarche in human females. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82: 3239-3245.
- 12 Thomas T Gori F Khosia S, et al. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblast and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*, 1999, 140: 1630-1638.
- 13 Iwaniec UT, Shearon CC, Heaney RP, et al. Leptin increases number of mineralized bone nodules *in vitro*. *Bone*, 1998;23:S212.
- 14 Liu C, Grossmanne A, Bain S, et al. *Annual Meeting of the ASBMR*, 1997, S21 1, 50.
- 15 Jan O. Gordanladze, Janne ER, et al. Pharmacological interference with transcriptional control of osteoblasts: A possible role for leptin and fatty acids in maintaining bone strength and bone lean mass. *Curr Pharm Des*,

(下转第 419 页)

同时成骨细胞分泌的 OPG 可以和 RANKL 结合从而竞争性阻滞了 RANK 与 RANKL 结合,达到调控 OC 分化和功能作用。由此,成骨细胞表达 OPG 和 RANKL 的比例可能是调节破骨细胞的关键因素^[13], Asami 等学者^[14]发现小鼠去卵巢后 RANKL 表达升高,而 OPG 表达下降。OPG 和 RANKL 主要由成骨细胞和骨髓基质细胞分泌,调控二者的表达水平就决定了对破骨细胞的调控方向。

简单而言影响骨吸收的是破骨细胞,但掌握调控破骨细胞的分化和成熟的关键却是成骨细胞和基质细胞。因此本研究在选题时着重讨论蛇床子素影响成骨细胞对调控破骨细胞的中心途径,即检测对 OPG 和 RANKL 的 mRNA 表达的影响,从而从该角度阐明蛇床子素对骨代谢作用的机理。

我们的研究发现在加药对成骨细胞影响 48 h,即可以观察到两基因都已有表达,相对空白对照组,OST 上调 OPG mRNA 的表达 ($P < 0.05$),但对 RANKL 的表达无显著影响,但 OPG/RANKL 比值已经较正常空白对照组变大,对破骨细胞已经有明显的抑制作用;7 d 时 OPG 和 RANKL 表达都有增加,OST 上调 OPG 的表达 ($P < 0.01$),OST 在 10^{-5} mol/L 下调 RANKL 的表达 ($P < 0.05$),而在 OST 的低浓度 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L 观察到对 RANKL 有降低表达的趋势,各浓度的 OST 都使 OPG/RANKL 比值较空白对照组增大,提示了蛇床子素可能抑制破骨细胞的分化、成熟的作用,OC 的生成减少,活性减弱,从而抑制骨吸收。本实验中的 OPG 表达量变化幅度不大,以及 RANKL 表达存在变化的趋势但无显著性,可能与实验时间因素有关,OPG 和 RANKL 都未达到表达的高峰。

综上所述,在本研究中发现 OST 可以主要上调大鼠成骨细胞中 OPG 基因的表达,同时轻微降低 RANKL 的表达,提高 OPG/RANKL 的比率,继而达到抑制 OC 的分化和活性,使骨吸收降低,进一步证实具有抑制破骨细胞骨吸收的作用。在其早期无明显的改变和趋势。但本研究仅仅是利用 RT-PCR 对几种因子在转录水平的检测,至于两种组织中每种因

子 mRNA 表达量的确切变化、蛋白水平的情况及每种因子在组织中的具体定位有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 张新勇,向仁德. 蛇床子化学成分的研究. 中草药,1997,28:588.
- 2 李朝阳,吴铁,李青南,等. 蛇床子总香豆素与尼尔雌醇对去卵巢大鼠骨代谢的影响. 中国药理学报,1997;18:286-288.
- 3 Terence JW. Changing perceptions in osteoporosis. British Medicine Journal, 2001, 49: 256-260.
- 4 Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell, 1997, 87 (2):309-319.
- 5 Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANKL mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 3540-3545.
- 6 Aubin JE, Bonny E. Osteoprotegerin and its Ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. Osteoporosis international, 2000, 11: 905-913.
- 7 Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell. 1998, 93(2): 165-176.
- 8 Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 253(2):395-400.
- 9 王洪复主编. 骨细胞图谱与骨细胞体外培养技术. 上海:上海科学技术出版社, 2001:62.
- 10 Li QN, Liang NC, Wu T, et al. Effects of total coumarins of Fructus Cnidii on ovariectomized rats. Acta pharmacologica Sinica, 1994, 15: 528-532.
- 11 Li Xiaoxia, Hara Ichie, Matsumiya Teruhiko. Effects of Osthole on postmenopausal osteoporosis using ovariectomized rats; comparison to the effects of estradiol. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25(6): 738-742.
- 12 李朝阳. 蛇床子素对去卵巢大鼠近侧胫骨代谢影响的定量研究. 药理学报, 1996, 31(5):327-332.
- 13 Thomas GJ, Baker SUK, Eisman JA, et al. Changing RANKL/OPG mRNA expression in differentiating murine primary osteoblasts. J Endocrinol, 2001, 170:451-460.
- 14 Asami T, Inada M, Mizunuma H, et al. Expression of osteoblast differentiation factor (ODF/RANKL/OPGL) in trabecular bone and bone marrow B-Lymphocytes in OVX mice. J Bone Miner Res, 1999, 14(Suppl 1): 1079.
- 18 Jan O. Gordeladze, Janne ER, et al. Pharmacological interference with transcriptional control of osteoblasts: A possible role for leptin and fatty acids in maintaining bone strength and bone lean mass. Curr Pharm Des, 2001, 7:275-290.
- 19 Manolagas SC. The role of IL-6 type cytokines and their receptor in bone. Ann N Y Acad Sci, 1998, 840: 194-204.

(收稿日期:2004-05-10)

(上接第 431 页)

2001, 7:275-290.

- 16 Gordeladze JE, Syversen U, Bakke I, et al. 2001 a, J Cell Biochem, in press.
- 17 Stepan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, et al. Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. Regul Pept, 2000, 92: 73-78.

(收稿日期:2003-11-05)