

17- α 雌二醇对体外培养成骨细胞影响的实验研究

汪现 刘来奎 翁玲玲 苏敏 郑虎

【摘要】 目的 观察 17- α 雌二醇对体外培养成骨细胞增殖和成骨功能的影响。方法 用植块培养法从乳鼠中分离出成骨细胞,倒置显微镜观察其形态,碱性磷酸酶(ALP)染色来鉴定细胞。然后用不同浓度的 17- α 雌二醇作用于成骨细胞,使用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色分析、ALP 含量测定、细胞钙含量测定来检测其对成骨细胞增殖和成骨功能的影响。结果 17- α 雌二醇以剂量方式促进各项指标的表达,促进成骨细胞的增殖和骨形成。结论 17- α 雌二醇具有促进成骨细胞的增殖和骨形成作用,值得作进一步的研究。

【关键词】 17- α 雌二醇;成骨细胞;骨质疏松症;差向异构体

Effect of 17- α estradiol on osteoblasts cultured *in vitro* WENG Xian, LIU Laikui, WENG Lingling, et al. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of 17- α estradiol on osteoblasts (OB) cultured *in vitro*. **Methods** OB were isolated from rats and the cell morphology was observed by alkaline phosphatase (ALP) staining. 17- α estradiol in different concentrations was added to the OB, which were incubated. The effect of 17- α estradiol on the proliferation and osteogenesis of OB was monitored by MTT analysis, ALP activity and calcium contents determination. **Results** The MTT(OD), ALP and calcium contents of the cultured cells as well as the cell proliferation were higher in 17- α estradiol group than those in control group ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner. It suggested that 17- α estradiol promoted the proliferation and osteogenesis of OB. **Conclusions** 17- α estradiol promotes the proliferation of OB and bone formation.

【Key words】 17- α estradiol; Osteoblasts; Osteoporosis; Epimers

有研究表明,使用雌激素替代疗法治疗雌激素缺乏引起的骨质疏松症后,不仅骨吸收减少,骨形成也增加^[1]。而报道提示雌激素通过雌激素受体介导而起作用^[2]。

17- α 雌二醇是 17- β 雌二醇的差向异构体。它们对雌激素受体及其亚型 ER- α 和 ER- β 的亲合力存在差异^[3]。与 17- β 雌二醇比较,17- α 雌二醇只有很弱的雌激素活性^[4];但却与 17- β 雌二醇一样具有对心血管系统的有益作用^[5]。由此我们想到:将有可能在 17- α 雌二醇类化合物及衍生物中寻找在生殖组织中只产生较弱的雌激素样作用,而对骨骼却有着类似雌激素的有益作用的新化合物。因此,进行 17- α 雌二醇促骨生长的细胞实验,考察其是否具有

促骨生长的活性,是一项很有意义的工作。

材料和方法

1. 动物及试剂

出生 1 d 内的昆明乳鼠,由华西医学中心实验动物中心提供。17- α 雌二醇(自制,熔点与文献一致,经元素分析、四谱结构确证),DMEM-F12 培养基(Gibco 产品),胎牛血清(FBS)(Sigma 公司),0.25% 胰蛋白酶(Sigma 公司),1 mg/ml II 型胶原酶(Sigma 公司),碱性磷酸酶(ALP)抗体(博士德公司),骨钙素抗体(博士德公司),SABC 免疫组织化学检测试剂盒(博士德公司),MTT 试剂盒(南京建成生物工程研究所),ALP 含量检测试剂盒(杭州迪安科技实业有限公司)。

2. 成骨细胞的分离、培养

本实验采用植块培养法,原代细胞长满瓶壁后,

作者单位:400065 重庆市,重庆市中药研究院(汪现、苏敏);四川大学华西口腔医学院(刘来奎);四川大学华西药学院(翁玲玲、郑虎)

于无菌条件下进行传代。骨组织植块在培养 24 h 后,可见少量梭形或多边形细胞从骨片植块边缘长出,并随时间延长细胞数量逐渐增多。2 d 后,相邻植块长出的细胞可以汇合。分离的成骨细胞在培养于 24 h 后活细胞贴壁生长,死细胞悬浮于培养液中。贴壁生长的细胞可为梭形或多边形。2~3 d 后换培养液除去死细胞,培养 6 d 后基本长满瓶壁。成骨细胞在单层铺满培养瓶后可出现重叠生长。传代培养的细胞生长较快,接种后 2 h 即已贴壁,3 d 细胞长满瓶壁。

3. 培养成骨细胞的鉴定

①活体观察:原代成骨细胞形态不规则,呈多角形、三角形,有较多的突起,单核呈卵圆形,1~3 个核仁,胞浆丰富、清晰,细胞突起可互相联接。连续培养十几代的成骨细胞,可见胞体增大,胞浆稀疏,胞核缩小等退行性改变。②碱性磷酸酶染色(ALP)染色呈阳性。③骨钙素免疫组织化学染色呈阳性反应。

4. 实验分组及实验方法

(1)实验分组

实验共分为 5 组,其中 1 组为对照组,其余 4 组为分别加入浓度为 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} mol/L 的 17- α 雌二醇实验组。

(2)MTT 比色分析(增殖率)、ALP 活性及细胞钙含量测定

取第 3 代成骨细胞消化制成细胞悬液,以每 24 孔为一平行样本,按 90 μ l/孔以 2×10^5 /ml 的浓度接种于 96 孔培养板,每一平行样本内分别按加入 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} mol/L 浓度的 17- α 雌二醇 10 μ l,使其最终浓度分列为 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} mol/L,对照组加入等量完全培养基。每隔 3 d 换液一次。培养 7 d 后分别检测进行 MTT 比色分析、ALP 活性及细胞钙含量测定。

(3)不同浓度的 17- α 雌二醇对不同时段成骨细胞 ALP 活性影响的动态观察

分组及培养同上,分别检测不同浓度实验组在第 3、5、7、10、14 d 等不同时段细胞 ALP 活性。

5. 实验方法

(1)增殖率的测定

采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色分析测定成骨细胞样细胞的增殖率。

细胞经 0.25% 的胰蛋白酶消化,离心弃上清液, MEM(10% NCS)稀释到一定浓度,接种 96 孔培养板,每孔加入无血清培养液 100 μ l,常规培养 24 h,换液,

分别加不同浓度的 17- α 雌二醇培养。测定前 4 h,用 PBS 冲洗后更换无血清 MEM 培养液 100 μ l,同时加入 10 μ l 0.5% MTT(PBS 溶解配制,棕色瓶 4℃ 保存),培养箱 37℃ 孵育 4 h,吸出上清液,加 100 μ l 10% SDS(0.01 mol/L HCL 配制)37℃ 下 2 h,冷至室温后在酶标仪上(波长 570 nm)测定 A 值(吸光度)。

(2)ALP 活性测定

采用磷酸对硝基苯酯(PNPP)二钠盐法测定培养成骨细胞 ALP 活性。

细胞经 0.25% 的胰蛋白酶消化,离心弃上清液, MEM(10% NCS)稀释到一定浓度,接种 96 孔培养板,每孔加入无血清培养液 100 μ l,常规培养 24 h,换液,分别加不同浓度的 17- α 雌二醇培养。细胞汇合前取 20 μ l 于 96 孔板,加入底物反应液(PNPP-DEA 溶液:MgCl₂·6H₂O 101.7 mg, 12 mol/L(N) HCl 1.95ml, DEA 10ml 加蒸馏水至 50 ml;临用前与 3 mmol/L PNPP 等量配制), 37℃ 水浴 10 min,加 90 μ l 0.1 mol/L(N) NaOH 终止反应。

向培养板内加入 200 μ l 的 10% TritonX-100 裂解细胞,按试剂盒说明要求操作,在酶联免疫仪上,选择 405 nm 波长测定其 A 值(吸光度)。

(3)细胞钙含量测定

采用 Connerty^[6] 等方法。

6. 统计学处理

为 SPSS10.0,结果以均数 $\pm$ 标准差表示,方法为 *t* 检验。

结 果

1. 17- α 雌二醇对成骨细胞增殖率、ALP 活性、细胞钙含量的影响

表 1 17- α 雌二醇对成骨细胞 MTT、ALP 活性、细胞钙含量的影响

组别	样本数 (只)	MTT (A 值)	ALP (U/L)	细胞钙含量 (μ g/ 2×10^5)
对照组	6	0.69 $\pm$ 0.10	2.45 $\pm$ 0.52	54.01 $\pm$ 36.23
10 ⁻⁵ M 组*	6	1.32 $\pm$ 0.03	4.36 $\pm$ 0.25	102.55 $\pm$ 34.85
10 ⁻⁶ M 组*	6	1.72 $\pm$ 0.02	6.15 $\pm$ 0.72	125.50 $\pm$ 32.12
10 ⁻⁷ M 组*	6	0.72 $\pm$ 0.13	3.45 $\pm$ 0.36	68.75 $\pm$ 28.45
10 ⁻⁸ M 组*	6	0.54 $\pm$ 0.09	2.67 $\pm$ 0.28	60.30 $\pm$ 33.20

注:与对照组比较 * *P* < 0.05

由表 1 可看出:10⁻⁵、10⁻⁶ mol/L 组的 ALP 活性与对照组比较 *P* < 0.05,而 10⁻⁷、10⁻⁸ mol/L 组与对照组比较没有显著性差异,显示浓度低于 10⁻⁷ mol/L 时不能显著地对成骨细胞 ALP 活性产生影响。说明浓度

为促进成骨细胞生长及提高 ALP 活性的重要因素，只有浓度在 10^{-7} mol/L 以上才有效。

2. 不同时段 17-α 雌二醇对成骨细胞 ALP 活性的影响

表 2 不同时段 17-α 雌二醇对成骨细胞 ALP 活性的影响

组别	样本数 (只)	ALP 活性				
		3 d	5 d	7 d	10 d	14 d
对照组	6	2.14 ± 0.70	2.25 ± 0.83	2.45 ± 0.52	1.36 ± 0.31	1.34 ± 0.38
10^{-5} mol/L 组 *	6	2.56 ± 0.86	2.34 ± 0.65	4.36 ± 0.25	2.75 ± 0.54	2.71 ± 0.68
10^{-6} mol/L 组 *	6	4.28 ± 0.67	5.03 ± 0.72	6.15 ± 0.78	5.32 ± 0.36	4.32 ± 0.57
10^{-7} mol/L 组 *	6	2.69 ± 0.47	3.03 ± 0.38	3.45 ± 0.36	2.03 ± 0.39	1.65 ± 0.45
10^{-8} mol/L 组	6	2.16 ± 0.41	2.64 ± 0.34	2.67 ± 0.28	1.98 ± 0.54	1.35 ± 0.36

注: 对照组比较 * $P < 0.05$

由表 2 可见, 10^{-6} mol/L 浓度组的 ALP 活性增加最为显著, 而不同浓度实验组的 ALP 活性均在第 7 d 达到高峰。

讨 论

1. 17-α 雌二醇促进成骨细胞增殖

绝经后骨质疏松是由于雌激素水平下降, 引起成骨作用降低, 破骨作用增加, 导致骨矿含量下降及骨胶原减少。有研究发现雌激素(17-β 雌二醇)能刺激成骨细胞增殖, 也有一些则报道抑制成骨细胞增值^[7,8]。因此, 雌激素对成骨细胞的作用机制仍不是十分清楚。

本实验结果显示: 较高浓度(10^{-5} 、 10^{-6} mol/L)的 17-α 雌二醇的实验组的细胞增殖率显著地高于相应的对照组, 显示一定浓度的 17-α 雌二醇能促进成骨细胞生长, 从而对骨形成过程起促进作用。

2. 17-α 雌二醇升高碱性磷酸酶的活性

碱性磷酸酶^[9]可由成骨细胞产生, 是成骨细胞成熟和分化的标志, 其作用是水解有机磷释放出无机磷用于羟基磷灰石的形成, 是骨形成过程中的催化剂, 能促进骨基质的矿化。

本实验显示, 10^{-5} 、 10^{-6} mol/L 实验组在培养 3、5、7、10、14 d 后碱性磷酸酶活性均显著地高于对照组 ($P < 0.05$)。成骨细胞样细胞在培养过程中能检出碱性磷酸酶, 显示培养的细胞能合成和分泌碱性磷酸酶。说明 17-α 雌二醇能提高碱性磷酸酶活性, 促进骨形成, 使成骨细胞样细胞向成骨细胞转化。

在生理状态下, 雌激素(包括雌酚酮、17-β 雌二醇、17-α 雌二醇)大量存在于人和哺乳动物的血清中, 所以对照组中也有碱性磷酸酶的释放。

3. 17-α 雌二醇提高骨钙水平

细胞钙含量是成骨细胞分化的重要指标之一,

钙是骨形成过程中必不可缺的重要元素; 在骨钙素的作用下, 钙能维持骨的正常矿化, 特异性地反应成骨细胞活性及骨转化率。

10^{-5} 、 10^{-6} mol/L 实验组的细胞钙含量也显著地高于相应的对照组, 说明一定浓度的 17-α 雌二醇能促进成骨细胞生长及钙含量增加, 从而对骨形成过程起促进作用。

4. 17-α 雌二醇促进成骨细胞样细胞增值和促进骨形成实验的意义

近期研究发现: 雌激素受体(ER)存在两种亚型, ER-α 和 ER-β, 两者不同点是 C 末端配基结合位点及 N 末端转移激活位点。ER 的亚型决定了 ER 配基结合的亲和力以及组织的分布不同, 也决定了 ER 激动剂及拮抗剂在不同组织中的选择活性。

17-α 雌二醇由于其对雌激素受体及其亚型(ER-α 和 ER-β 受体)结合的亲和性的无差别, 使 17-β 雌二醇表现为对乳腺组织、子宫、卵巢以及骨组织都是完全的激动剂, 这正是雌激素替代疗法一方面能预防绝经后骨质丢失; 另一方面也因其对女性生殖器官的刺激作用而产生的副反应的原因; 而选择性雌激素受体调节剂则不刺激女性生殖器官, 同时具有促进成骨细胞的成骨作用。本实验初步证实了 17-α 雌二醇也具有一种类似的对雌激素受体的选择性作用; 对此的一个可能的解释是, 因为 17-α 雌二醇对 ER-α 和 ER-β 受体结合有较大的差异性, 17-β 雌二醇对 ER-α 和 ER-β 受体的亲和力差别不大(分别为 0.3 和 0.4), 而 17-α 雌二醇对 ER-β 的亲和力(1.2)远大于对 ER-α 的亲和力(0.2)^[3], 而骨组织中的雌激素受体及其亚型(ER-α 和 ER-β)的分布与表达与子宫、乳腺组织中不一样, 从而导致 17-α 雌二醇对以上组织的选择性生理作用。

正常女性的雌激素水平随年龄的增长而迅速下

降是引起骨密度下降并导致骨质疏松的主要原因。本研究显示 17- α 雌二醇具有促进成骨细胞样细胞生长并分泌碱性磷酸酶,提高骨钙水平的作用。由于 17- α 雌二醇不具有雌激素样作用,这使它将不仅可用于女性的绝经后骨质疏松症的治疗,还将可能用于男性的骨质疏松症及相关疾病的治疗和预防。

因此,17- α 雌二醇的研究在骨量丢失的预防以及骨质疏松症的治疗方面显示了潜力。本实验为这方面的进一步研究提供了实验依据。实验所初步证实的 17- α 雌二醇所具有的在体外促进成骨细胞样细胞增殖及促进骨形成的生理作用,对促进局部成骨细胞增殖作用,骨的形成和重塑,预防骨质疏松症的发生,加强骨折的愈合有着积极意义。可以此为先导化合物,进行以基于 17- α 、 β 雌激素类化合物与体内大分子之间的严格手性匹配与分子识别的结构改造;或者以此为工具药,进行以雌激素受体及其亚型为主的深入的药理实验,将有可能发现新的雌激素受体及其亚型,促进新的高效低毒的骨质疏松预防和治疗药物的研究。

参 考 文 献

- 1 Bain SD, Baily MC, Celino DL, et al. High-dose estrogen inhibits bone resorption and stimulates bone formation in the ovariectomized mouse. *J Bone Miner Res*, 1993; 8: 435-442.
- 2 Kaplan BS, Terpening CM, Benz DJ. Estrogen binding receptor mRNA and biological response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science*, 1988; 241: 81-84.
- 3 Lotz W. Biological activities and receptor affinities of some natural and synthetic oestrogens and their D-homo analogues. *Specialia*, 15 (15): 1373-1377.
- 4 Tsutomu Nishihara. Estrogenic activity of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *Journal of Health Science*, 2000, 46 (4): 282-298.
- 5 Dittrich R. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1999, 107: 53-57.
- 6 Connerty HV, Briggs AR. Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalien complexone. *Am J Clin Pathol*, 1966, 45: 290-294.
- 7 Huo B, Dossing DA, Dimuzio MT, et al. Generation and characterization of a human osteosarcoma cells line stably transfected with the human estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res*, 1995, 10: 769-774.
- 8 Watts CKW, King RJB. Overexpression of estrogen receptor in HTB96 human osteosarcoma cells results in estrogen-induced growth inhibition and receptor cross talk. *J Bone Miner Res*, 1994, 13: 2919-2925.
- 9 Caplan AL, Pechak DG. The cellular and molecular embryology of bone formation. In: Peck C, ed. *Bone and mineral research (Vol 5)* Amsterdam: Elsevier, 1987, 117-183.

(收稿日期: 2003-10-23)

(上接第 470 页)

影响与睾酮可在周围组织中转化为雌激素维持骨量有关^[7]。

糖尿病骨量的改变取决于峰值骨量及其后的骨量丢失,高糖状态易引起渗透性利尿,钙、磷、镁排泄增多,肾小管对钙磷等重吸收减少,肠道钙磷吸收减少,故糖尿病患者易发生骨质疏松。但本研究中本组 2 型糖尿病患者骨密度与对照组差别不大,可能由于 2 型糖尿病多 40 岁以后起病,骨形成率降低则可延缓年龄相关性骨丢失,且 2 型糖尿病常伴有肥胖、高胰岛素血症,使骨形成、骨量增加,骨骼应力增加,而且,脂肪组织具有转化为性激素维持骨量的作用^[7]。但糖尿病状态下骨吸收大于骨形成,又可导致骨量净丢失增加,故 2 型糖尿病骨量可表现为正常、增高或降低^[8]。

我们还发现 2 型糖尿病患者 BMI 高于对照组,多元回归分析后显示, BMI 与腰椎 3、4 骨密度显著相关 ($P = 0.01$),可能也与肥胖、高胰岛素血症,使骨骼应力和骨形成增加有关,与 Willing 等^[9]报道 BMI 可影响 BMD 的结论一致。

参 考 文 献

- 1 Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, et al. Association of bone mineral density with the polymorphism of estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res*, 1996, 11: 306-311.
- 2 Bagger YZ, Jorgensen HL, Heegaard AM, et al. No major effect of estrogen receptor gene polymorphism on bone mineral density or bone loss in postmenopausal Danish women. *Bone*, 2000, 26: 111-116.
- 3 Giguere Y, Rousseau F. The genetics of osteoporosis: complexities and difficulties. *Clin Genet*, 2000, 57: 161-169.
- 4 Lau EM, Young RP, Lam V, et al. Estrogen receptor gene polymorphisms and bone mineral density in postmenopausal Chinese women. *Bone*, 2001, 29: 96-98.
- 5 黄琪仁, 王钦红, 张良平, 等. 绝经后健康妇女雌激素受体基因多态性与骨密度关系的研究. *中国骨质疏松杂志*, 1998, 4: 38-41.
- 6 安胜军, 李恩. 骨代谢过程中雌激素的作用及其与细胞因子的关系. *国外医学生理、病理科学与临床分册*, 1999, 19: 273-275.
- 7 车琦, 周智广. 糖尿病的骨量改变及其机理. *中国糖尿病杂志*, 1998, 6: 171-173.
- 8 Thomas DM, Ng KM, Best JD. Insulin and bone: a clinical scientific review. *Endocrinol Metab*, 1997, 4: 5-17.
- 9 Willing M, Sowers M, Aron D, et al. Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction. *J Bone Miner Res*, 1998, 13: 695-705.

(收稿日期: 2003-04-15)