

妊马雌酮对大鼠体外培养成骨细胞作用的研究

韩庆国

【摘要】 目的 探讨妊马雌酮对大鼠体外培养成骨细胞的作用效果及对成骨细胞增殖的作用机理。**方法** 采用新生大鼠颅骨进行分离成骨细胞,并在含 10% 的胎牛血清 DMEM 中进行体外培养,分别加入高、低剂量妊马雌酮并与阴性组进行对照,用 MTT 法进行成骨细胞增殖和活性检测,用 Western 免疫印迹检测蛋白激酶 C、抗凋亡蛋白 Bag-1 表达。**结果** 在培养 24 h 后,妊马雌酮对培养成骨细胞增殖有明显的促进作用,培养到 48 h 促进作用更为明显,表现出一定的时间相关性。妊马雌酮能明显提高体外成骨细胞 PKC 的表达量和抗凋亡蛋白 Bag-1 的表达量。**结论** 妊马雌酮可促进成骨细胞增殖并明显提高 PKC 和抗凋亡蛋白 Bag-1 的表达量是其防治骨质疏松的机理之一。

【关键词】 妊马雌酮; 成骨细胞; 蛋白激酶 C; 抗凋亡蛋白 Bag-1

Effects of premarin on rat osteoblasts in vitro HAN Qingguo. Life Science College, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

【Abstract】 Objective To study the effect and mechanism of premarin on rat osteoblasts *in vitro*. **Methods** The osteoblasts were separated from the skull of new-born rats, and were cultured in 10% bovine serum DMEM. High and low dosage premarin was separately added and compared with blank group. In the end, osteoblasts were tested through MTT method. Expression of PKC and Bag-1 were assayed by Western-blot. **Results** Premarin promoted the multiplication of osteoblasts cultured for 24 hours while the effect was even strengthened after 48 hours. Expression quantity of PKC and anti-apoptosis protein Bag-1 was increased remarkably. **Conclusions** Premarin prevents and treats osteoporosis by promoting multiplication of osteoblasts and enhancing the expression of PKC and anti-apoptosis protein Bag-1.

【Key words】 Premarin; Osteoblasts; PKC; Bag-1

随着人口的老龄化,骨质疏松症的研究越来越受到人们的重视。在诸多药物治疗中,雌激素替代疗法是防治骨质疏松有效的方法^[1]。妊马雌酮(Premarin 商品名“倍美力”)作为共轭雌激素的一种,副反应相对较少,长期临床应用表明有较好疗效^[2]。为进一步探讨其作用机制,笔者较为系统的研究了 Premarin 对体外培养大鼠成骨细胞的作用。

材料和方法

1. 材料

(1) 动物

1 日龄 SD 大鼠 6 只(广州中医药大学实验动物中心提供,实验动物合格证号:98A016),用于分离原代成骨细胞。

(2) 药品

Premarin 注射液 25 mg/支(Wyeth-Lederle 中国有限公司,批号:552DIN)。DMEM(Gibco)、L-谷氨酰胺(华美生物工程公司)、HEPES(Sigma)、小牛血清(中国科学院上海细胞所)、胰蛋白酶(Sigma)、II 型胶原酶(Sigma)、青霉素、链霉素、EDTA(上海试剂一厂 AR 级);一抗:PKC(MC5)为鼠 IgG_{2a} 单克隆抗体, Bas-1(C-16)为兔抗鼠羧基端 Bag-1 p32 多克隆抗体。一抗:辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 和羊抗兔 IgG 多克隆抗体。以上两种抗体均为 Santa Cruz Biotechnology, Inc. 产品。

2. 方法

(1) 新生大鼠颅骨成骨细胞分离与培养

新生 1 日龄 SD 大鼠 6 只,75% 酒精浸泡 15 min, 揭去头皮,取出头盖骨,剔除结缔组织,PBS 洗 3 次,0.25% 胰蛋白酶预消化 25 min,再用 0.1% II 型胶原

酶 37℃ 下震荡消化, 60 次/min, 1 h × 2 次, 1000 r/min 合并细胞悬液离心 8 min。细胞沉淀经 PBS 洗后, 加入含 10% 的 NCS-DMEM 培养液中培养, 第 2 天换培养液, 以后每 2~3 d 更换。

待细胞铺满培养瓶底, 进行传代, 弃去原培养液, 用 D-hank's 液冲洗 2 遍, 每瓶加入 0.25% 的胰蛋白酶消化, 相差显微镜下观察细胞, 约 4 min 细胞成圆形, 弃去消化液, 加入培养液, 吹打培养瓶底, 使细胞脱落, 计数, 制成细胞悬液, 接种于新的培养瓶中, 置于 37℃、5% CO₂ 中静置培养。

(2) 成骨细胞的鉴定

形态学观察: 观察成骨细胞在最初分离和培养单层时的情况, 并长期观察细胞的分泌情况。

四环素标记: 接种于培养瓶中的细胞, 每 2 d 换液, 观察细胞分泌情况和骨小结节的形成。接种 2 w 后, 在培养皿中加入四环素, 浓度为 50 μg/ml, 培养 1 h 后, 在 LEICA 镜下做落射荧光观察。

矿化结节茜素红染色的观察: 细胞按 5 × 10⁴/孔接种于 24 孔板内, 接种第 2 天更换含药培养液, 以后每 2 d 换液 1 次, 连续 14 d, 吸去培养液, PBS 冲洗, 95% 酒精固定 10 min, 弃酒精, PBS 冲洗 2 次, 加入 0.1 茜素红染色液 30 min 后在光镜下观察, 并计数。

(3) 药物对培养成骨细胞的作用

传 2 代成骨细胞以 5 × 10⁴/ml, 1 × 10⁵/瓶密度接种于 120 ml 培养瓶, 于 24 h 后加入终浓度 10⁻⁶、10⁻⁷ mol/L 的 Premarin 溶液, 培养 24、48 h 后 PBS 冲洗培养细胞 3 次, 加入 1 × SDS 加样缓冲液至培养皿中 (500 μl/培养瓶), 刮下细胞, 将细胞裂解液吸入微量离心管中。-85℃ 冻存, 以备 Western 免疫印迹检测。

(4) MTT 法成骨细胞增殖和活性检测

成骨细胞以 5 × 10³/孔接种于 24 孔培养板, 24 h 后, 10⁻⁶、10⁻⁷ mol/L Premarin 药物处理, 培养 24、48 h 后 PBS 冲洗, 更换无药培养液, 每培养孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl, 培养箱中孵化 24 h, 吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 150 μl DMSO, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。平行设只加培养液的空白对照孔调零, 490 nm 波长比色, 酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值。

(5) Western 免疫印迹检测蛋白激酶 C (PKC), Bag-1 表达

取培养的成骨细胞, 沸水煮 5 min, 超声破碎, 室温下 10 000 g 离心 10 min, 上清液 20 μl 行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 蛋白质电转膜。25 ml TBS 在室温

下洗涤 PVDF 膜 5 min, 室温下与 25 ml 封闭液孵育 1 h, 15 ml TBS/T 洗膜 5 min × 3 次。一抗 (PKC 抗体和 Bag-1 抗体) 溶解与 PVDF 4℃ 反应过夜, 15 ml TBS/T 洗膜。HRP 标记的二抗用封闭液按 1:2000 稀释, 与 PVDF 膜室温下轻轻振荡孵育 1 h, 15 ml TBS/T 洗膜。PVDF 膜浸泡在 10 ml lumiGLO® (0.5 ml 20 × lumiGLO®, 0.5 ml 20 × 过氧化氢和 9 ml 超纯水) 中, 室温下轻轻振荡 1 min。滤干膜上过多液体, 包被 PVDF 膜与胶片曝光。

结 果

1. 成骨细胞的鉴定

细胞形态观察: 最初分离的鼠成骨细胞是立方形, 48 h 后可见大量细胞贴壁, 培养 14 d 后, 原代细胞长成单层。传代细胞 10 d 内长成单层, 细胞由 I 型胶原的分泌, 排出胞外, 集结成结节状, 在高倍镜下可见培养液中有大量黑色颗粒出现。四环素荧光标记观察: 细胞有黑色结节形成, 荧光下可见呈同心排列的黄色结节。茜素红染色可见呈红色的圆形骨结节产生。

2. Premarin 对成骨细胞增殖作用的影响

在培养 24 h 后, Premarin 对培养成骨细胞增殖有明显的促进作用, 培养到 48 h 促进作用更为明显, 表现出一定的时间相关性, 在 24 h 到 48 h, 随时间延长而作用更显著。虽然高剂量组比低剂量组对培养成骨细胞增殖的促进作用似乎更为明显, 但组间尚无显著性差异, 不能确定其剂量相关性, 表 1。

表 1 Premarin 对成骨细胞增殖作用的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

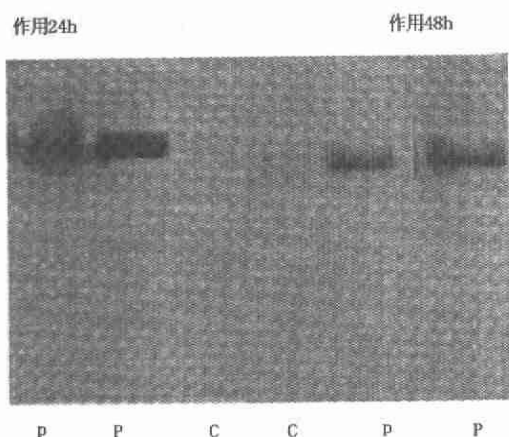
组别	24h	48h	同组不同时间比较的 P 值
对照组	0.114 ± 0.020	0.163 ± 0.018	< 0.01
低剂量组	0.157 ± 0.018**	0.235 ± 0.025**	< 0.01
高剂量组	0.168 ± 0.027**	0.262 ± 0.031*	< 0.01

注: 与对照组相比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与低剂量组相比较 □ $P < 0.05$, □□ $P < 0.01$

3. Premarin 对培养成骨细胞蛋白激酶 C (PKC) 的表达的影响

Premarin 对培养成骨细胞 PKC 的表达见图 1。可见 Premarin 能明显提高体外成骨细胞 PKC 的表达量, 且表现为一定的时间相关性和剂量相关性, 其中, 高剂量组 10⁻⁶ mol/L Premarin 溶液处理的成骨细胞较低剂量组 PKC 表达量高。

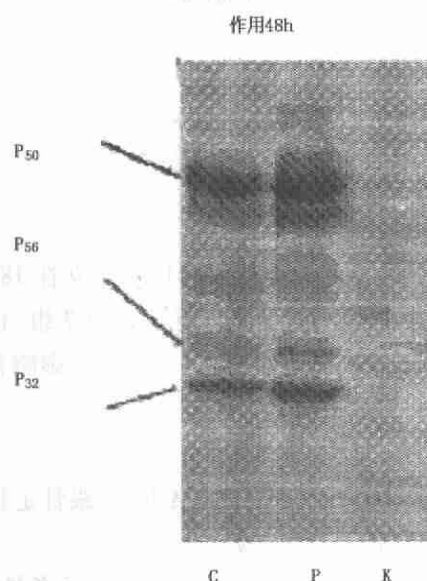
4. Premarin 对培养成骨细胞抗凋亡蛋白 Bag-1 表达的影响



注: C: 阴性对照, P: Premarin 高剂量组, p: Premarin 低剂量组

图 1 Western 免疫印迹检测蛋白激酶 C(PKC) 表达

Premarin 对培养成骨细胞抗凋亡蛋白 Bag-1 表达结果见图 2, 空白对照组几乎没有产生 Bag-1 的表达, 未加药对照组的成骨细胞 Bag-1 有一定的表达量, 高剂量 Premarin 处理成骨细胞 Bag-1 3 个成分 P_{50} 、 P_{36} 、 P_{32} 的表达量均较对照组升高, 其中 P_{50} 增加最为明显。显示高剂量组 Premarin 溶液对成骨细胞 Bag-1 的表达有良好的促进作用。



注: C 为未加药对照组; P 为 Premarin 高剂量组; K 为空白对照组

图 2 Western 免疫印迹检测 Bag-1 表达

讨 论

基于成骨细胞和破骨细胞在骨质疏松症中所起到的关键作用, 在骨质疏松症的研究中, 通常用体外培养的破骨细胞和成骨细胞进行关于骨吸收与骨形成的研究^[3]。本研究探讨了 Premarin 对成骨细胞作用途径中的一些基本问题。

实验结果表明, Premarin 对体外培养成骨细胞都有促进细胞增殖和活性的作用。在培养 24 h 后, Premarin 对培养成骨细胞增殖有明显的促进作用, 培养到 48 h 促进作用更为明显, 表现出一定的时间相关性, 在 24 h 到 48 h, 随时间延长而作用更显著。

蛋白激酶 C(PKC) 是一种介导细胞内信号转导的效应蛋白, 是一种 Ca^{2+} 依赖性和磷脂依赖性蛋白激酶, 在体内能被甘油二酯(DG)活化^[4]。PKC 作为细胞内信号转导和促进细胞功能状态转变的重要因子, 其表达量的改变提示细胞功能状态的改变和相关功能基因的转录和表达等核内和细胞质内生物学事件的发生^[5-7]。通过 Western 免疫印记实验发现 Premarin 能明显提高体外培养成骨细胞 PKC 的表达量, 且表现出明显的量-效关系, 提示 Premarin 可促进 PKC 的表达, 从而促进成骨细胞增殖。

Bag-1 是伴侣分子协调物(cochaperones)中的一个家族, 至少包括 4 个不同的成员^[8]: Bag-1L、Bag-1M/RAP46、Bag-1 和 P_{29} 。本实验观察到, Premarin 处理细胞 Bag-1 3 个成分的表达量均较对照组升高, 其中 Bag-1(P_{50})增加最为明显。由于 Bag-1 参与的主要是抗凋亡, 其他成分则参与核受体功能的调节。因此, Premarin 体外抗成骨凋亡是由于提高 Bag-1 和 Bcl-2 表达量, 抑制 Bax 表达而达到的共同结果, 而且上调 Bag-1 的表达量在调节途径上是更早出现的生物学事件。另外, Premarin 还可通过提高 Bag-1 的表达量, 对细胞核受体功能进行调节, 参与骨质疏松症发生及药理作用的一些激素或其他因子都具有核受体^[9-11], Premarin 可能通过提高 Bag-1 的表达量来上调或下调这些核受体的功能, 从而调节这些核受体与配体结合后可能启动的下游生物学事件, 如基因的转录或转录的抑制等。

Premarin 可以通过上调 Bag-1 的表达量, 作用于 Hsc70 热休克蛋白家族其他成员, 或通过其他分子伴侣蛋白的作用, 进而促进雌激素核受体的功能, 使其在较低的雌激素水平下, 雌激素-受体复合物也能启动相关基因的转录和表达, 从而在一定程度上恢复由雌激素水平下降带来的改变。

参 考 文 献

- 1 Riksen EF, Kassem, Landaul B. European and north american experience with HRT for the prevention of osteoporosis. Bone, 1996, 119 (5s): 179s-183s.
- 2 Pisha E, Liu X, Constaminou AI, et al. Evidence that a metabolite of

(下转第 482 页)

值 BUA 接近日本女性, SOS 和 STI 高于日本。与本地区 DEXA 测量峰值相比, 男、女性 QUS 峰值早于 DEXA 5 ~ 10 年^[6], 可能由于 QUS 还反映了 BMD 外的信息, 如骨骼的结构、弹性等, 年龄轻者骨结构弹性较好, 因而年轻时 QUS 参数值即升高, 另外, 峰值骨的年龄与被测部位的松质骨和皮质骨的组成比例有关, 松质骨含量越高峰值年龄越早, 跟骨结构主要是松质骨, 因而 QUS 参数峰值年龄较轻。

(2) 随增龄骨量丢失情况: 随着年龄增长, 跟骨超声 3 项参数均下降, 但下降的起始时间和速度明显不同, 男性 40 ~ 49 岁有个下降过程, 此后下降趋于平稳。女性从 50 岁开始跟骨所有参数显著下降, 骨量丢失的速度和幅度明显增加, 快速骨丢失持续约 20 年, 这种变化反应女性生理变化, 与女性受绝经和衰老的双重影响有关, 同时也提示跟骨超声参数值可区分绝经前和绝经后的女性。超声参数值与年龄呈负相关的变化, 反映随年龄增加骨的弹性下降, 脆性增加以及强度下降, 有研究报道在人 30 ~ 90 岁期间骨强度下降 14% ~ 30% 左右, 本研究显示: 在超声的 3 项参数中 STI 累积丢失率最高, 男性为 13.6%、女性 21.5%, SOS 最低男性 1.8%、女性 3.5%, 与石家庄等地区报道相一致^[7], STI 为 BUA 和 SOS 两者线性的组合, 能全面衡量骨丢失率的情况, 是骨质量的综合评价指标。

(3) 随增龄 OP 的患病率和骨折的发生率情况: 不论男女随增龄 OP 患病率和骨折的发生率越高, 尤其是女性显著高于男性, 部分人还有不同程度的多次多部位骨折。本文统计一生中女性 OP 患病率为 53%, 骨折率 13%; 男性 OP 为 32%, 骨折率 7%。国外有研究报道^[8] 超声测量结果可用于诊断 OP 症, 并

可预测骨折的危险, 大量研究表明跟骨 SOS 与跟骨 BMD 具有高度相关性, BMD 的减少, SOS 也近线性减少, 这一关系表明 OP 性骨折的危险性, 但发生骨折的因素除骨量外还有其他因素如骨质量变化, QUS 法可能比传统 BMD 法可提供更多关于骨折危险的信息, 在于它具有测量 BMD 以外的骨强度特征, 如超声 BUA 值受 BMD 和骨结构的共同影响, 当发生 OP 时 BMD 减少, 骨皮质变薄, 骨小梁网稀疏、断裂等结构改变, BUA 值变小, 骨强度下降。本研究资料显示随着年龄增长超声参数值 BUA、SOS、STI 越低, OP 患病率和骨折发生率却越高, 表明 QUS 在临床上能很好地诊断 OP 并能预测骨折的危险性。

参 考 文 献

- 1 他得安, 余建国, 汪源源, 等. 诊断骨质疏松症的超声参量. 中华超声影像学杂志, 2003, 12: 305-307.
- 2 刘忠厚, 杨定焯, 朱汉民, 等. 中国人骨质疏松症建议诊断标准. 中国骨质疏松杂志, 2000, 6: 1-3.
- 3 伍贤平, 廖二元, 周智广. 定量超声诊断骨质疏松症的研究近况. 中国超声医学杂志, 1998, 14(3): 61-63.
- 4 安珍, 杨定焯, 王文志, 等. DEXA 测量 BMD 与超声测量 SOS 比较. 中国骨质疏松杂志, 2001, 7(1): 42-44.
- 5 赵宝珍, 郝牡丹, 毛晓红, 等. 山西地区正常人骨定量超声测定及评价. 中国骨质疏松杂志, 2003, 9: 259-261.
- 6 卓铁军, 周明秀, 申志祥. 南京地区 5 168 人双能 X 线骨密度测定分析. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8: 104-106.
- 7 张秀梅, 王亚平, 魏玲格, 等. 跟骨定量超声法评价正常女性骨丢失和骨质疏松患病率. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8: 206-207.
- 8 Yoh K, Makita K, Kishimoto H, et al. Correlation between cut-off value determined by using quantitative ultrasound and threshold of fracture in Japanese women. J Bone Miner Res, 2002, 17 (Suppl): 420.

(收稿日期: 2004-06-18)

(上接第 479 页)

- equine estrogens, 4-hydroxyequilenin, induces cellular transformation *in vitro*. Chem Res Toxicol, 2001, 14: 82-90.
- 3 Eun Mi Choi, Kwang Sik, Young Seol Kim, et al. Soybean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. Phytochemistry, 2001, 56: 733-739.
 - 4 Yoshida Y, Huang FL, Nakabayashi H, et al. Tissue distribution and developmental expression of protein kinase C isotypes. J Biol Chem, 1998, 263: 9868-9873.
 - 5 Cheng AL, Chuang SE, Robert LF, et al. Inhibition of the membrane translocation and activation of protein kinase C, and potentiation of doxorubicin-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by tamoxifen. Biochemical Pharmacology, 1998, 55: 523-531.
 - 6 Housey GM, Johnson MD, Hsiao WL, et al. Overproduction of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblasts. Cell, 1988,

52: 343-354.

- 7 Persons DA, Wilkison WW, Bell RM, et al. Altered growth regulation and enhanced tumorigenicity of NIH 3T3 fibroblasts transfected with protein kinase C-1 cDNA. Cell, 1988, 52: 447-458.
- 8 Cato AC, Mink S. BAG-1 family of cochaperones in the modulation of nuclear receptor action. J Steroid Biochem Mol Biol, 2001, 78: 379-388.
- 9 Qi JF, Wang QP. Study of estrogen receptor in cancellous bone of ovariectomized rat. J Fourth Mil Med Univ, 1999, 20: 554-555.
- 10 Takayama S, Sato T, Krajewski S, et al. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. Cell, 1995, 80: 279-284.
- 11 Hohfeld J. Regulation of the heat shock conjugate Hsc70 in the mammalian cell: the characterization of the anti-apoptotic protein BAG-1 provides novel insights. Biol Chem, 1998, 379: 269-274.

(收稿日期: 2004-05-08)