

肿瘤坏死因子- α 对小鼠骨髓基质细胞护骨素表达的影响

向光大 廖二元 王运林 罗湘杭 戴如春 周厚德 肖新华

摘要: **目的** 探讨肿瘤坏死因子- α (TNF- α)对骨髓基质细胞护骨素(OPG) mRNA 和蛋白质表达的影响以及 TNF- α 在骨代谢中的作用。**方法** 用 TNF- α 干预培养的小鼠骨髓基质 MBA-1 细胞,用 RT-PCR 和 Western blot 检测 TNF- α 不同剂量和不同作用时间时 OPG 表达变化。**结果** ①MBA-1 细胞表达 OPG;②TNF- α 对 MBA-1 细胞 OPG mRNA 和 OPG 蛋白质表达有下调作用,但无剂量和时间依赖性;③17- β 雌二醇(17- β E₂)能阻断 TNF- α 对 MBA-1 细胞 OPG 表达的下调作用;而吡咯二硫氨基甲酸酯(PDTC,一种核因子- κ B 抑制剂)不能拮抗此作用。**结论** TNF- α 下调 OPG 表达。雌激素拮抗 TNF- α ,使 MBA-1 细胞 OPG 表达上调。TNF- α 对 OPG 表达的影响与转录因子- κ B 信息通路无关。

关键词: 骨髓基质细胞;护骨素;肿瘤坏死因子- α ;17- β 雌二醇

Effects of tumor necrosis factor-alpha on expressions of osteoprotegerin mRNA and OPG protein in mouse marrow stromal MBA-1 cell lines. XIANG Guangda, LIAO Er'yun, WANG Yunlin, et al. Institute of Endocrinology & Metabolism, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China

Abstract: **Objective** To observe the effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) on the expressions of osteoprotegerin (OPG) in mouse bone marrow stromal MBA-1 cells, and investigate the potential roles of TNF- α in the pathogenesis of osteoporosis. **Methods** The expressions of OPG mRNA and OPG protein was assayed by RT-PCR and Western blot in BMA-1 cells treated with TNF- α in different concentrations and at different time-periods of cultures. **Results** (1) OPG was expressed in BMA-1 cell lines. (2) TNF- α downregulated the expression of OPG in BMA-1 cells in a dose-and time-independent manner. (3) 17 β -estradiol suppressed the downregulation of TNF- α on the expression of OPG, whereas pyrroline dithiocarbamate (PDTC) (inhibitor of nuclear factor- κ B) had no effects on its downregulation. **Conclusions** TNF- α enhances osteoclastic bone resorption and bone loss by decreasing the expression of OPG in bone marrow stromal MBA-1 cells. The mechanism involved in the therapeutic effect of estrogen may associate with the suppression of OPG expression, but the signaling pathway that regulates OPG expression by TNF- α is not involved in the activation of nuclear factor- κ B.

Key words: Bone marrow stromal cells; Osteoprotegerin; Tumor necrosis factor- α ; Osteoprotegerin 17 β -estradiol

雌激素缺乏是绝经后妇女骨质疏松症的主要病因,在绝经后的 5~10 年间,其骨量快速丢失达 10%~15%。以前的研究显示,绝经后女性血液循环中 IL-6 和 TNF- α 水平升高或趋于升高。一些细胞因子如白介素-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等可刺激破骨细胞分化,增加骨吸收,导致骨量丢失^[1]。

护骨素(OPG)是肿瘤坏死因子受体超家族成

员,它通过抑制破骨细胞分化增加骨密度^[2]。有研究报道,雌激素刺激人成骨细胞 OPG mRNA 和蛋白的表达,而糖皮质激素则抑制其表达^[1];雌激素也刺激小鼠基质 ST-2 细胞株 OPG 的表达^[3]。然而,有关 TNF- α 对骨髓基质细胞 OPG 表达影响的研究国内外尚未见有关报道。本研究旨在探讨 TNF- α 对骨髓基质细胞 OPG 表达的影响,了解 TNF- α 在绝经后妇女骨质疏松症发生与发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠骨髓基质细胞株(MBA-1)为以色列 Weiz-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970347)

作者单位:410011 长沙,中南大学湘雅二医院代谢内分泌研究所(廖二元、王运林、罗湘杭、戴如春、周厚德、肖新华);广州军区武汉总医院内分泌科(向光大)

通讯作者:廖二元, Email:eyliao2003@21cn.com

mann 大学 Shamy 教授馈赠;无酚红 DMEM 培养液, 0.25%胰酶-EDTA、抗坏血酸、重组鼠肿瘤坏死因子(TNF)- α 、吡咯二硫氨基甲酸酯(PDTC)、 17β -雌二醇(17β -E₂)、胎牛血清(FBS)均为 Sigma 产品;羊抗 OPG 多克隆抗体、鹿抗羊 IgG 过氧化物酶抗体、ECL 发光试剂盒、硝酸纤维素膜均为美国 Santa Cruz 公司产品;逆转录试剂盒为 Promega 公司产品;Trizol 为 GIBICO 公司产品;胎牛血清白蛋白(BSA)由晶美生物公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: MBA-1 复苏后,用无酚红的 DMEM 培养液于 25 cm² 培养瓶,在含 5% CO₂ 的培养箱中 37℃ 培养,培养液中含 10% FBS、抗坏血酸 100 μ g/ml、青霉素 50 U/ml、庆大霉素 50 μ g/ml。每 3 d 换液 1 次。汇片后弃培养液,用 0.25% 胰酶-EDTA 消化细胞。细胞接种于 25 cm² 培养瓶。

1.2.2 干预试验: MBA-1 细胞接种于 25 cm² 培养瓶,用含 10% FBS 的无酚红 DMEM 培养,汇片后换含 0.1% 胎牛血清白蛋白的无血清 DMEM 培养 24 h,再分别用 TNF- α 和 17β -E₂ 及 PDTC 进行干预。分组如下:① TNF- α 0 ng/ml;② TNF- α 10 ng/ml;③ TNF- α 20 ng/ml;④ TNF- α 40 ng/ml;⑤ TNF- α 20 ng/ml + 17β -E₂ 10⁻⁸ mol/L(17β -E₂ 先预处理 6 h);⑥ TNF- α 20 ng/ml + PDTC 100 μ mol/L(PDTC 先预处理 6 h),干预 24 h;或用 TNF- α 20 ng/ml 干预 0, 3, 6, 12, 24 和 48 h。

1.2.3 总 RNA 抽提:所有 RNA 操作用品均用 0.1% DEPC 水处理 37℃ 过夜,玻璃器皿置 180℃ 干烤 8 h 以上,RNA 操作用试剂均用 DEPC 处理过的水配制。按 Trizol 操作说明书提取总 RNA。

1.2.4 半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 MBA-1 细胞 OPG mRNA 表达:在 Gene Amp 2400 PCR 扩增仪上进行 RT-PCR;取 2.0 μ g 总 RNA 用逆转录试剂盒合成 cDNA;再取 cDNA 进行 PCR 扩增 OPG, GAPDH 基因。引物序列如下:

OPG:上游 5'-TCC TGG CAC CAT CCT AAA ACA GCA-3';

下游 5'-CTA CAC TCT CTG CAT TCA CTT TGG-3'。

GAPDH:上游 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3';

下游 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。

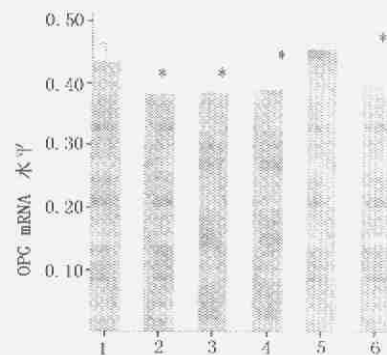
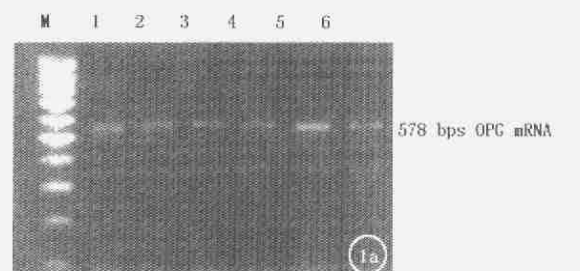
PCR 按常规方法进行,循环数均为 30。

1.2.5 细胞总蛋白的提取:用 Trizol 按常规操作方法提取细胞总蛋白。将蛋白溶于 1% SDS 中,

10 000 g, 4℃ 离心 10 min, 弃沉淀;Bradford 方法测蛋白含量。

1.2.6 Western blot 方法检测 OPG 蛋白质表达:方法参照分子克隆实验指南。取 50 μ g 细胞总蛋白于 7.5% SDS-PAGE 凝胶中电泳,再电转移至硝酸纤维素膜上;羊抗 OPG 多克隆抗体(1:1000 稀释)一抗杂膜 4 h;再用辣根过氧化物酶标记的驴抗羊二抗(1:4000 稀释)杂膜 1 h;ECL 发光自显影,用 Imagemaster VDS 成像分析系统行条带光密度检测。

1.2.7 统计学处理:各实验独立重复 3 次,用 SPSS 10.0 软件统计,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析。



TNF- α 0 10 20 40 20 20 (ng/ml)

17β -E₂ 0 0 0 0 10⁻⁸ 0 (mol/L)

PDTC 0 0 0 0 0 100 (μ mol/L)

图 1 不同浓度 TNF- α 对 BMA-1 细胞 OPG mRNA 表达的影响

1a: OPG mRNA; 1b: GAPDH mRNA。M 为 GeneRuler TM 100bp DNA Ladder, 与 TNF- α 0 ng/ml 和 TNF- α 20 ng/ml + 17β -E₂ 10⁻⁸ mol/L 组比较, $P < 0.05$

2 结果

2.1 MBA-1 细胞 OPG mRNA 表达: 半定量 RT-PCR

结果显示,与 TNF- α 0 ng/ml 组比较, TNF- α 10 ng/ml 组、TNF- α 20 ng/ml 组、TNF- α 40 ng/ml 组 OPG mRNA 水平明显降低 ($P < 0.05$); TNF- α 20 ng/ml + 17β -E₂ 10^{-8} mol/L 组 OPG mRNA 水平明显高于 TNF- α 10 ng/ml 组、TNF- α 20 ng/ml 组、TNF- α 40 ng/ml 组 ($P < 0.05$), 与 TNF- α 0 ng/ml 组相似 ($P > 0.05$); TNF- α 20 ng/ml + PDTC 100 μ mol/L 组 OPG mRNA 水平明显低于 TNF- α 0 ng/ml 组和 TNF- α 20 ng/ml + 17β -E₂ 10^{-8} mol/L 组 ($P < 0.05$), 与 TNF- α 10 ng/ml、TNF- α 20 ng/ml、TNF- α 40 ng/ml 组相似 ($P > 0.05$) (图 1)。

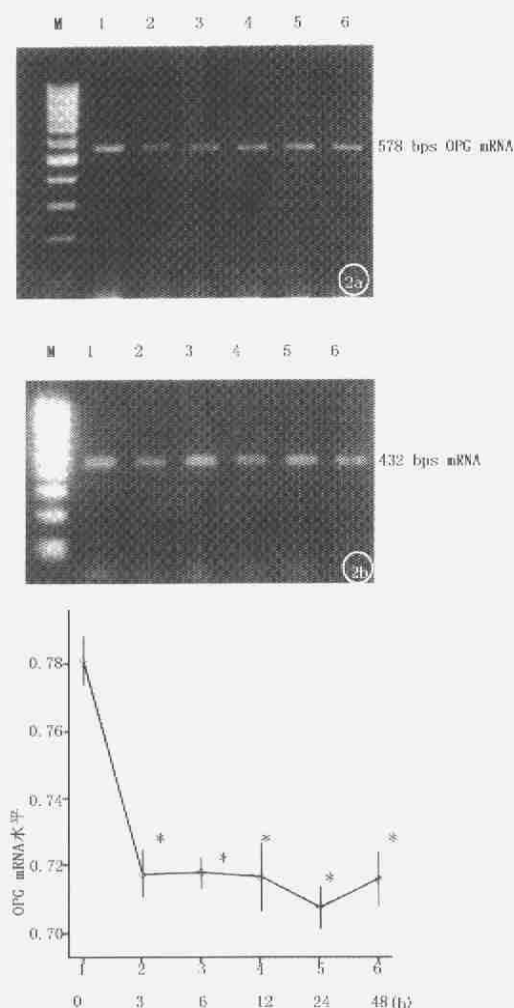


图2 在 TNF- α 20 ng/ml 不同作用时间条件下 OPG mRNA 表达
2a: OPG mRNA, 2b: GAPDH mRNA。M 为 GeneRuler™ 100bp DNA Ladder。1~6 分别代表 TNF- α 20 ng/ml 干预 0、3、6、12、24 和 48 h。与 0 小时组比较 * $P < 0.05$

在 TNF- α 20 ng/ml 浓度不同作用时间条件下, 与 0 h 组比较, 3、6、12、24 和 48 h 组 OPG mRNA 水平明显降低 ($P < 0.05$); 在 3、6、12、24 和 48 h 之间 OPG mRNA 水平差异无显著性 (图 2)。

2.2 MBA-1 细胞 OPG 蛋白质表达: 与 OPG mRNA 表

达相平行, 与 TNF- α 0 ng/ml 组比较, TNF- α 10 ng/ml、TNF- α 20 ng/ml、TNF- α 40 ng/ml 组 OPG 蛋白质表达明显降低 ($P < 0.05$); TNF- α 20 ng/ml + 17β -E₂ 10^{-8} mol/L 组 OPG 蛋白质表达明显高于 TNF- α 10 ng/ml、TNF- α 20 ng/ml、TNF- α 40 ng/ml 组 ($P < 0.05$), 与 TNF- α 0 ng/ml 组相似; TNF- α 20 ng/ml + PDTC 100 μ mol/L 组 OPG 蛋白质表达明显低于 TNF- α 0 ng/ml 和 TNF- α 20 ng/ml + PDTC 100 μ mol/L 组 ($P < 0.05$), 与 TNF- α 10 ng/ml、TNF- α 20 ng/ml、TNF- α 40 ng/ml 组相似 (图 3)。

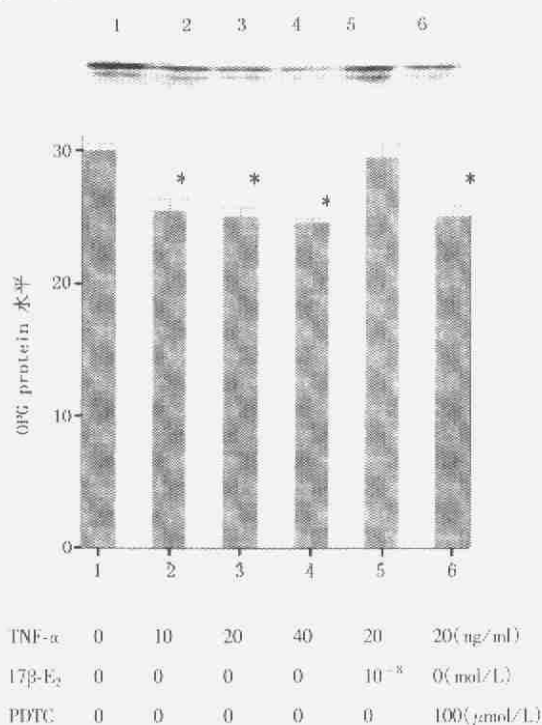


图3 不同浓度 TNF- α 对 BMA-1 细胞 OPG 蛋白质表达的影响

1. TNF- α 0 ng/ml; 2. TNF- α 10 ng/ml 组; 3. TNF- α 20 ng/ml 组; 4. TNF- α 40 ng/ml 组; 5. TNF- α 20 ng/ml + 17β -E₂ 10^{-8} mol/L 组; 6. TNF- α 20 ng/ml + PDTC 100 μ mol/L 组; 与 TNF- α 0 ng/ml 和 TNF- α 20 ng/ml + 17β -E₂ 10^{-8} mol/L 组比较 * $P < 0.05$

在 TNF- α 20 ng/ml 浓度不同作用时间条件下, 与 0、3、6、12、24 和 48 h 组 OPG 蛋白质表达明显降低 ($P < 0.05$); 在 3、6、12、24 和 48 h 之间 OPG 蛋白表达水平相似 ($P > 0.05$) (图 4)。

3 讨论

OPG 是近年来发现的一种分泌型可溶性受体蛋白, 属于 TNF 受体超家族成员, 可与 TNF 家族的另一成员——核因子- κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 结合。OPG 作为 RANKL 的‘诱饵’受体, 阻止 RANKL 与其在破骨前体细胞上的功能受体 RANK 结合, 从

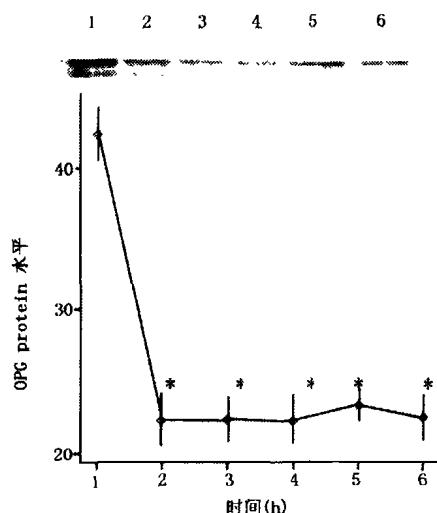


图4 在 TNF- α 20 ng/ml 不同作用时间条件下 OPG 蛋白质表达
注:1~6 分别为 TNF- α 20 ng/ml 干预 0、3、6、12、24 和 48 h;与 0 h 组比较 * $P < 0.05$

而抑制破骨细胞的分化^[4],故有抑制骨吸收的作用。由于大多数来自骨吸收因子的信号汇聚于 RANKL-RANK 系统^[5],因而认为 OPG 对 RANKL 的功能起着重要的调节作用。体内实验表明,给正常大鼠注射重组 OPG 蛋白^[2]或在转基因鼠超表达 OPG 均使骨量增加;相反,敲除小鼠 OPG 基因可导致破骨细胞活性增加引起严重的骨质疏松症^[6]。因此,在骨代谢平衡中 OPG 是抑制骨吸收的主要调节因子。

TNF- α 是体内主要的细胞因子之一。TNF- α 抑制成骨细胞或成骨样细胞的 DNA 和胶原合成,及抑制骨钙素基因的表达;刺激蛋白分解酶如纤维蛋白溶酶原激活质、基质金属蛋白酶,以及 IL-8 的合成。

在本研究中我们首次发现,小鼠骨髓基质 MBA-1 细胞用 TNF- α (10~40 ng/ml) 干预后,OPG mRNA 和蛋白质表达下降,而且无时间和剂量依赖性;当加用 17β -E₂ 10^{-8} mol/L 后,OPG mRNA 及蛋白质水平又恢复到 TNF- α 0 ng/ml 组水平,提示 17β -E₂ 可阻断 TNF- α 对 MBA-1 细胞 OPG mRNA 和蛋白质表达的调控效应;当加用核因子- κ B (NF- κ B) 的抑制剂 (PDTC) 后,OPG mRNA 及蛋白质水平没有变化,提示 TNF- α 对 OPG 表达的影响不是通过 NF- κ B 信息途径实现的。

TNF- α 在绝经后妇女骨质疏松症中的作用目前还不完全清楚。有研究报道,绝经后妇女血液循环中 TNF- α 水平升高^[7];也有研究报道,在雌激素缺乏状态下,TNF- α 引起骨质疏松^[1]。用雌激素处理成骨样细胞、单核巨噬细胞、培养的全血细胞,可抑制 TNF- α 的释放和表达;当撤除雌激素后,TNF- α 的表

达和释放又增加。此外,TNF- α 又可促进蛋白分解酶如纤维蛋白溶酶原激活质、基质金属蛋白酶^[5]及 IL-8^[1]等的合成;另一方面,TNF- α 抑制 DNA 和胶原的合成及骨钙素基因的表达^[1]。国内的研究报道,甲状腺旁腺素相关肽抑制小鼠骨髓基质细胞 OPG mRNA 的表达^[8]。在本研究中我们发现,TNF- α 也可抑制 MBA-1 基质细胞 OPG mRNA 和蛋白质的表达。因此推测,TNF- α 在绝经后妇女骨质疏松的发生与发展中起重要作用。

雌激素能抑制骨吸收,减少骨丢失,这是绝经后妇女骨质疏松症患者用雌激素补充治疗的主要依据,但其确切的分子机制尚未完全清楚。Hofbauer 等^[9]报道,雌激素刺激人成骨细胞 OPG 基因和蛋白质的表达。Saika 等^[3]报道,雌激素刺激小鼠骨髓基质 ST-2 细胞 OPG 基因表达。在本研究中, 17β -E₂ 中和了 TNF- α 对 MBA-1 细胞 OPG 表达的下调作用,提示雌激素抑制骨吸收的作用除作用于成骨细胞外,还作用于前成骨细胞(如骨髓基质 MBA-1 细胞),上调其 OPG 的表达及阻止 TNF- α 对其 OPG 表达的调节有关。

核因子- κ B (NF- κ B) 是体内重要的转录因子。在基础状态下 NF- κ B 存在于胞浆,并与其抑制蛋白 I κ B 结合,当受到适当刺激后,NF- κ B 与 I κ B 分离,NF- κ B 进入核内,发挥基因调控作用。目前发现,TNF- α 对多数靶细胞的作用是通过 NF- κ B 介导的^[10]。然而在本研究中当加入 NF- κ B 抑制剂 PDTC 后,并不改变 TNF- α 对 MBA-1 细胞 OPG 表达的下调作用。这提示 TNF- α 对 MBA-1 细胞 OPG 表达的影响是通过非 NF- κ B 信息途径起作用的,其确切的信息途径还有待于进一步研究。

Zipori 等^[11]于 1984 年采用 SJL/J 小鼠骨髓基质细胞长期培养,克隆出 MBA-1,它呈成纤维状。体内实验证实 MBA-1 具有成骨细胞表型特征^[12],为成骨细胞的前体细胞。1994 年 Otsuka 等^[13]报道,MBA-1 细胞在基础状态下无 IL-6 表达,而 TNF- α 可诱导性表达 IL-6 基因对脂多糖 (LPS) 的刺激尤为敏感。我们首次发现 MBA-1 细胞也可表达 OPG,TNF- α 下调 MBA-1 细胞 OPG 表达,雌激素可阻断 TNF- α 下调 MBA-1 细胞 OPG 表达,TNF- α 下调 MBA-1 细胞 OPG 表达的信息通路与 NF- κ B 信息途径无关。然而国内外有关 MBA-1 细胞株功能的研究较少,它是否表达其它骨代谢相关因子,如 OPGL、IL-8、TNF- α 、M-CSF 等还值得进一步研究。

(下转第 16 页)

通过促进 bax 从胞浆中移至线粒体膜上,使 bax 在与 bcl-2 形成的异二聚体中占据优势来促进线粒体上的 PT 孔道开放,从而促进线粒体释放凋亡诱导因子造成的线粒体膜电位和生物合成的破坏,而达到促进凋亡的目的。

【参 考 文 献】

- [1] Soector DL, Goldman RD, Leinwand LA, 主编. 细胞实验指南. 北京:科学出版社,2001. 1165-1193.
- [2] 彭黎明,王曾礼,主编. 细胞凋亡的基础与临床. 北京:人民卫生出版社,2000. 23.
- [3] Hockenbery D, Oltval ZN, Yin XM, et al. Bcl-2 function in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. Cell, 1993, 75: 241.
- [4] 王媛,曾凡杰,黄晓明,等. 抗氧化剂阻抑 TNF 诱导的 U937 细胞凋亡. 肿瘤, 1999, 19: 35-38.
- [5] Li PF, Dietz R, Harsdorf R. P53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome C-independent apoptosis blocked by bcl-2. EMBO J, 1999, 18: 6027-6038.
- [6] Oltari Z, Milliman C, Korsmeyer ST. Bcl-2 heterodimers *in vivo* with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. Cell, 1993, 74: 609-619.
- [7] 彭黎明,王曾礼,主编. 细胞凋亡的基础与临床. 北京:人民卫生出版社, 2000. 66-68.
- [8] Kunz-Schughart LA, Habbersett RC, Freyer JP. Mitochondrial function in oncogene-transfected rat fibroblasts isolated from multicellular spheroids. Am J Physiol, 1997, 273: 1487-1495.
- [9] Osborne BA, Smith SW, Liu ZG, et al. Identification of genes induced during apoptosis in T cells. Immunol Rev, 1994, 142: 301-320.
- [10] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science, 1998, 281: 1309-1312.
- [11] Cheng EH, Kisch DG, Clem RT, et al. Conversion of bcl-2 to bax-like death factor by caspases. Science, 1997, 278: 1966-1968.
- [12] Read JC. Double identity for proteins of the bcl-2 family. Nature, 1997, 387 (6635): 773-776.

(收稿日期:2004-10-14)