

直接原位 RT-PCR 检测人成骨肉瘤 MG-63 细胞株雌激素受体亚型表达

杨开初 廖二元 罗湘杭 周后德

摘要: 目的 观察人成骨肉瘤 MG-63 细胞株雌激素受体亚型 mRNA 表达特征。方法 用直接原位 RT-PCR 及激光共聚焦显微镜观察 MG-63 细胞株在培养第 6 及第 9 天 ER α 、ER β mRNA 表达。结果 各检测点均见一定量的荧光弥散于细胞内。阳性对照点荧光较其他两点强,阴性对照点荧光明显减弱,仅见少量背景荧光。ER α 的荧光强度强于 ER β 。结论 (1)MG-63 细胞株作为成骨细胞模型,存在 ER α 和 ER β 基因的 mRNA 表达。(2)骨基质成熟早期阶段 MG-63 细胞株的 ER α 表达比 ER β 丰富,这表明两者在功能上存在差异。

关键词: 人成骨肉瘤 MG-63 细胞株; 雌激素受体亚型; 原位 RT-PCR; 激光共聚焦显微镜

mRNA expression of estrogen receptor subtypes in human osteosarcoma MG-63 cell lines by direct in situ RT-PCR YANG Kaichu, LIAO Eryuan, LUO Xianghang, et al. Department of Internal Medicine, Wujing Shenzhen Hospital, Shenzhen 518029, China

Abstract: **Objective** To investigate the characteristic of mRNA expression of estrogen receptor(ER) subtypes in human osteosarcoma MG-63 cell lines. **Methods** Direct in situ RT-PCR combined with laser scanning confocal microscopy was applied to detect the expression of ER α and ER β in MG-63 cell lines on the 6th and 9th day of cultivation. **Results** Diffused fluorescence can be seen within cells on the detection sports of every slides. The fluorescent intensity of positive control spots were stronger than that of the other two spots, and the negative control spots were significantly weaker with sparse background fluorescence. The fluorescence intensity of ER α was stronger than that of ER β on both the sixth and ninth day. **Conclusions** MG-63 cell lines have mRNA expression of ER α and ER β subtypes and ER α mRNA expression is stronger than that of ER β , suggesting their functional difference.

Key words: Human osteosarcoma MG-63 cell lines; Estrogen receptor subtypes; In situ RT-PCR; Laser scanning confocal microscopy

成骨细胞(osteoblast, OB)是雌激素直接作用的靶细胞。由于其来源丰富,一直是研究雌激素对骨骼作用的细胞及分子机制的主要材料。雌激素对骨组织细胞,尤其是成骨细胞的作用主要是由其核受体介导的。自 1986 年及 1996 年相继发现 ER α ^[1] 和 ER β ^[2,3] 以来,发现并克隆了多个受雌激素调控的功能基因。ER α 或 ER β 基因敲除的小鼠出现明显的骨量变化,说明两者在调节骨代谢、维持骨量平衡中发挥重要作用^[4,5]。由于 ER 在骨骼细胞中表达量很少^[6],用免疫组化和原位杂交等方法检测困难,必须用原位 RT-PCR 方法检测低表达丰度的基因。人成

骨肉瘤 MG-63 细胞株是一种人成骨细胞模型,中南大学代谢内分泌研究所以前曾通过对其生化特性与人成骨细胞(hOB)分化特性比较分析认为, MG-63 细胞株作为人成骨细胞模型仅代表分化早期阶段的人成骨细胞, I 型胶原在培养第 9 天后逐渐下降,第 6 天至第 12 天之间碱性磷酸酶(ALP)活性呈上升趋势^[7]。因此本研究取无干预培养的第 6 天及第 9 天作为观察点,首次应用原位 RT-PCR 联合激光共聚焦显微镜检测方法观察 MG-63 细胞株是否存在 ER 亚型 mRNA 水平的表达及初步比较两个亚型的表达特征,为进一步用雌激素等药物干预 MG-63 细胞株并观察在雌激素等药物干预下 ER 亚型之间的表达差异做准备。

作者单位: 518029 深圳,武警广东边防总队深圳医院内科(杨开初);中南大学湘雅二医院内分泌所(罗湘杭、廖二元、周后德)

通讯作者: 杨开初

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 仪器:激光共聚焦显微镜(1024 型)购自 Bio-Rad 公司。Gene Amp In Situ PCR 仪(System 1000 型)以及原位 PCR 载玻片、原位 PCR 反应体系密封件(AmpliCover Discs、AmpliCover Clips)均购自 Perkin Elmer 公司。

1.1.2 试剂:3-氨丙基三乙氧基甲硅烷(3-Aminopropyltriethoxy-silane, AES)、无酚红的 MEM 培养基、胰酶-EDTA、抗坏血酸、牛血清白蛋白(BSA)均购自 Sigma 公司;胎牛血清(FBS)购自 GIBICO 公司;焦碳酸二乙酯(DEPC)购自上海生工生物工程有限公司;蛋白酶 K、RQ1 RNase-Free DNase、逆转录试剂盒、Taq 酶、10×PCR 反应缓冲液、25 mmol/L MgCl₂、2 mmol/L dNTP 均购自 Promega 公司;DIG-11-dUTP、Anti-Digoxigenin-Fluorescein, Fab fragments 均购自 Roche 公司;引物均委托上海生物工程有限公司合成。ER α 正向引物为 5'-AATTCAGATAATCGA-CGCCAG-3', 反向引物为 5'-GTGTTTCAACATTC-TCCCTCCTC-3'。ER β 正向引物为 5'-TAGTGGTCCAT-CGCCAGTTAT-3', 反向引物为 5'-GGGAGCCACAG-TTCACCAT-3'。

1.2 细胞培养

人成骨肉瘤 MG-63 细胞株购自美国培养物保存中心(ATCC 号:CRL-1427),本实验所用 MG-63 细胞株为第 98 代细胞。人成骨肉瘤 MG-63 细胞株(98 代)复苏后,用无酚红的 MEM 培养液培养,其中含 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,稳定传 2 代后,将达汇片的 MG-63 细胞株接种至 6 孔板继续培养。

1.3 MG-63 细胞涂片制备

分别取培养第 6 和第 9 天人成骨肉瘤 MG-63 细胞株,用 DEPC 处理的 PBS 洗去残存培养液。各加 4 μ l PBS 至板孔中,用细胞刮轻轻刮落 MG-63 细胞,吸移至离心管中于 1500 r/min 离心 15 min,弃去上清液。用 1 ml DEPC 处理 PBS 重悬细胞,并用尖嘴滴管反复吹打散细胞。吸取 50 μ l 置于硅化载玻片上,每个玻片另设阳性对照和阴性对照各一点。干燥后用 4% 多聚甲醛固定液(PFA)固定细胞涂片(4 $^{\circ}$ C, 3 h);37 $^{\circ}$ C 蛋白酶 K(0.5 μ g/ml)消化 30 min 后,再次用 4% PFA 固定 1 h。依次在 70%、80%、90%、100% 乙醇中脱水,并存放于 100% 乙醇中(4 $^{\circ}$ C)。每个不同步骤之间用 PBS(DEPC 处理)浸洗 2 min。

1.4 原位 RT-PCR 检测 ER α 、ER β mRNA 表达

在 MG-63 细胞涂片上两点滴加 50 μ l 无 RNA 酶的 DNA 酶(1.0U/ μ l),消化细胞的内源性 DNA(37 $^{\circ}$ C, 3 h),其中阳性对照点不加 DNA 酶消化。配制反转录体系(50 μ l)如下:10×逆转录反应缓冲液 5 μ l,10 mmol/L dNTP 5 μ l,25 mmol/L MgCl₂ 10 μ l,Oligo-(dT)₁₅ 引物(500 μ g/ml)2.5 μ l,RNA 酶抑制因子(RNasin ribonuclease inhibitor)1 μ l,AMV 反转录酶(20 U/ μ l)1.5 μ l,加无核酸酶三蒸水至终体积 50 μ l。用 Amplicover 和 Ampliclips 密封 50 μ l 反应体系。置 Gene Amp In Situ PCR 仪(System 1000 型)中 70 $^{\circ}$ C 变性 10 min,42 $^{\circ}$ C 反转录 60 min,95 $^{\circ}$ C 5 min 灭活 AMV 反转录酶,保存于 4 $^{\circ}$ C 备用。

用 PBS 洗去反转录体系后,各点滴加 50 μ l PCR 反应体系并密封。ER α 和 ER β 的引物参照文献合成^[8]。扩增条件如下:10×PCR 反应缓冲液(含 25 mmol/L MgCl₂)5 μ l,2 mmol/L dNTP 5 μ l,1 mmol/L DIG-11-dUTP 0.3 μ l,正向引物(25 μ mol/L)及反向引物(25 μ mol/L)各 1 μ l,Taq 酶(5 U/ μ l)2 μ l,加去离子水至终体积 50 μ l,其中阴性对照点不加特异引物,其余同前。94 $^{\circ}$ C 4 min 预变性后,94 $^{\circ}$ C 1 min、65 $^{\circ}$ C 2 min、72 $^{\circ}$ C 3 min 为一个循环(共 20 个循环)。PCR 结束后,于 50 $^{\circ}$ C 用 2×SSC 浸洗细胞涂片 5 min,干燥后保存于 -20 $^{\circ}$ C。

1.5 原位 RT-PCR 产物的观察

用 4×SSC(灭菌三蒸水配制)为母液配制 1% BSA 溶液备用。以下步骤均在暗室中进行。取 1% BSA/4×SSC 溶液 1 ml,溶解 200 μ g 荧光素偶联的地高辛抗体并充分摇匀作为地高辛检测液的贮存液(200 μ g/ml)。取 120 μ l 贮存液,用 1% BSA/4×SSC 溶液将其稀释成浓度为 40 μ g/ml 的地高辛检测液的工作液。工作液配制后必须在 24 h 内使用完毕,贮存液可在 4 $^{\circ}$ C 保存两个月,因此应在使用前新鲜配制。各点滴加 50 μ l 工作液,置 37 $^{\circ}$ C 温育 45 min,然而在室温下分别用 4×SSC、0.1% Triton-X 100/4×SSC 及 4×SSC 三次浸洗细胞涂片,每次 10 min。干燥后立即于激光共聚焦显微镜下观察。

2 结果

2.1 从 4 张硅化载玻片中我们可以看出阳性对照点的荧光强度都强于检测点,阴性对照点荧光强度明显弱于检测点和阳性对照点,仅见少量背景荧光。

2.2 MG-63 细胞株内的 ER α 和 ER β 基因的转录产物(transcripts)经过 RT-PCR 扩增 20 个循环后均能检

测到。第 6 及第 9 天 $ER\alpha$ 的荧光强度均强于 $ER\beta$ 且显现荧光的细胞数也多于后者(图 1b 与图 2b 相比以及图 3b 与图 4b 相比)。

2.3 接种培养后第 9 天制备的细胞涂片从荧光强

度及显示荧光的细胞数目均强于和多于第 6 天的细胞涂片,且前者细胞分布较后者均匀,第 9 天的细胞涂片质量优于第 6 天的细胞涂片(图 1b 与图 3b 相比以及图 2b 与图 4b 相比)。

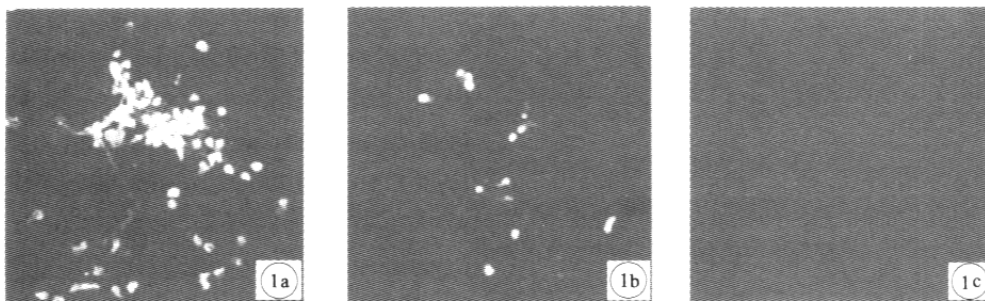


图 1 第 6 天 $ER\alpha$ 荧光图像($\times 200$);1a 为阳性对照点,1b 为检测点,1c 为阴性对照点

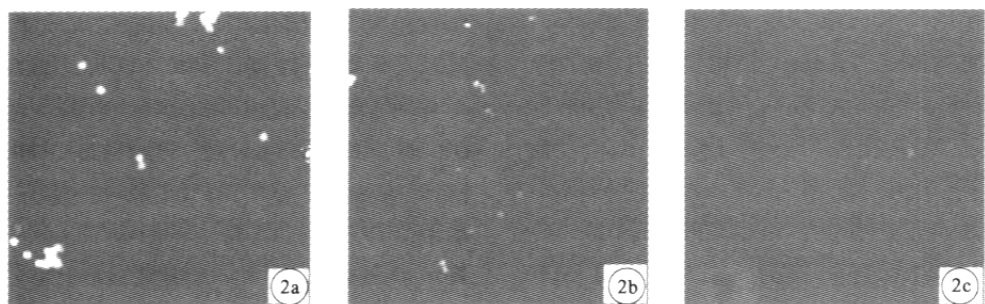


图 2 第 6 天 $ER\beta$ 荧光图像($\times 200$);2a 为阳性对照点,2b 为检测点,2c 为阴性对照点

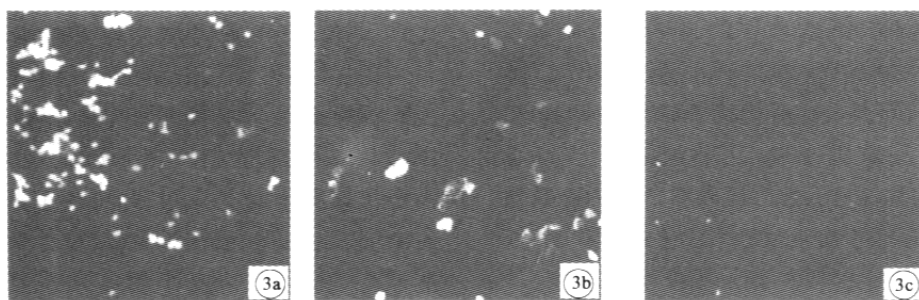


图 3 第 9 天 $ER\alpha$ 荧光图像($\times 200$);3a 为阳性对照点,3b 为检测点,3c 为阴性对照点

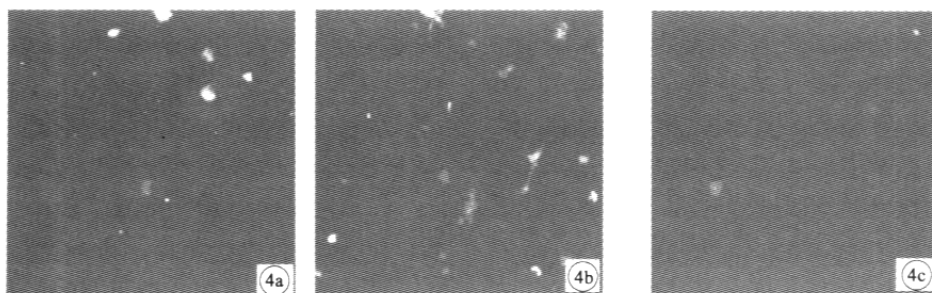


图 4 第 9 天 $ER\beta$ 荧光图像($\times 200$);4a 为阳性对照点,4b 为检测点,4c 为阴性对照点

3 讨论

原位 RT-PCR 最早在二十世纪九十年代初用来探测病毒 DNA 以及细胞内的单拷贝稀少基因的表达^[9,10],但现在已成为一种普遍采用的检测稀少基因转录产物的有效方法。一般可将其分为间接原位 RT-PCR 和直接原位 RT-PCR 两种。前者是原位 RT-PCR 与原位杂交(*in situ* hybridization, ISH)的机械结合,后者是在 PCR 反应体系中加入 DIG-11-dUTP,使扩增的某一特异 cDNA 中随机标记有 DIG-11-dUTP,PCR 结束后 cDNA 扩增产物已获得 ISH 所要达到的效果。如果在反转录阶段向逆转录体系中掺入 DIG-11-dUTP,就能观察到稀少表达基因的 mRNA 在细胞涂片或组织标本中的特异定位^[11-13]。

原位 RT-PCR 技术成败的关键在于反应体系的密封。Perkin Elmer 公司生产的 Ampli Cover Discs 和 Ampli Cover Clips 密封件较好地解决了这一难题。我们用其产品所作的 ER 亚型的 IS-RT-PCR 检测结果表明,其两个质控点——阳性对照点和阴性对照点均符合质控要求。阳性对照点荧光强度比检测点强,说明在内源性 DNA 中存在非特异性扩增,故在进一步原位 RT-PCR 研究中有必要将检测点和阴性对照点事先进行无 RNA 酶的 DNA 酶消化。阴性对照点除受到在 RT-PCR 结束后 DIG-11-dUTP 以及地高辛(DIG)检测液温育后抗地高辛抗体两种标记物未能被浸洗彻底的影响而造成高背景外,还受到抗体温育时非特异性结合的影响。如果两次浸洗不彻底或存在非特异性抗原抗体结合,将会造成阴性对照点背景太高。

一般认为,原位 RT-PCR 的扩增效率较低^[10,14]。有研究表明破骨细胞的维生素 D 受体 mRNA 的原位 RT-PCR 信号强度在扩增 10 个循环后仅为常规 ISH 检测到信号强度的 5 倍^[14,15]。常规 RT-PCR 由于不同引物之间扩增效率不同,且扩增效率较高,原始信号被放大失真,因此不同产物表达量之间不能进行比较。与常规 RT-PCR 相比,原位 RT-PCR 的 cDNA 扩增更符合线性增长方式。如果循环数不太高,在信号放大后,原位 RT-PCR 比常规 RT-PCR 更能反映某个基因原始转录量的多少,信号失真程度因而相对较小。本实验表明,由于 ER 亚型在 OB 细胞上表达丰度很低^[6],因此,用原位 RT-PCR 方法有助于检测像 ER 一样的表达量少但生物学效应强的基因转录产物。

Hoyland 等应用原位 RT-PCR 检测到人骨片上

OB、OC 和骨细胞上均存在 ER α 表达。随着循环数的增加,各种细胞的信号强度也增加。但 OB 细胞在达到 10 个循环数时,信号反而减弱^[16]。因此原位 RT-PCR 扩增随着循环数的增加其扩增量无明显平台期,这一点与常规 RT-PCR 又有所不同。

我们参照文献方法^[17],对 MG-63 细胞株的 ER α 和 ER β 亚型的反转录 cDNA 进行扩增,ER 的两个亚型均可被检测到。文献报道在正常人 OB 细胞存在 ER α 和 ER β ^[2,16]。我们应用直接原位 RT-PCR 方法首次证实,作为成骨细胞模型的 MG-63 细胞株同样表达 ER α 和 ER β 两个亚型。MG-63 细胞在 0~8 d 为细胞增殖阶段,6~18 d 为骨基质成熟阶段,16~18 d 后为骨质矿化阶段^[7]。从第 6 天及第 9 天的原位 RT-PCR 荧光图像可以看出,制备 MG-63 细胞涂片最好在骨基质成熟的早期阶段进行。MG-63 细胞一般在第 12 天开始出现明显骨结节形成,在第 9 天,细胞增殖阶段已经结束,而骨基质尚未完全成熟,细胞层胶原含量较少,因而对制备细胞悬液的影响较少。

激光共聚焦显微镜(LSCM)虽然仍属于光学显微镜范畴,但由于 LSCM 具有共聚焦成像及激光波长狭窄的优点,因此,其分辨率较普通荧光显微镜高 1.4 倍,所摄图像清晰度高^[18]。从图像中可以看出荧光弥散于整个细胞中,但是如果提前在反转录阶段就向反应体系中加入 DIG-11-dUTP,最后信号就会局限于细胞核内,即可 LSCM 下进行亚细胞定位观察。从荧光图像还可以看出,ER α 的荧光强度比 ER β 强,由于原位 RT-PCR 基本能反映扩增前基因原始转录量,因此我们认为 MG-63 细胞株 ER α 表达量比 ER β 丰富。这种表达差异在一定程度上表明 ER α 和 ER β 存在功能差异。本研究的 MG-63 细胞株处于骨基质成熟早期阶段,在这阶段 I 型胶原的表达达到峰值,ALP 活性基本接近峰值^[7],细胞处于成骨活性增长期。因此,我们推测 OB 细胞成骨性基因(如 ALP、I 型胶原、TGF- β 等)表达增多主要是由 ER α 介导的,ER β 不起作用,甚至在某一骨骼部位(如骨小梁)起拮抗作用^[5]。

本实验应用直接原位 RT-PCR 方法将 ER 亚型的 mRNA 反转录后进行 cDNA 扩增,扩增过程中对目的 cDNA 进行间接荧光标记,再应用 LSCM 进行荧光观察。实验中我们发现在 MG-63 细胞株的内源性 DNA 中存在与 ER 亚型类似的同源序列,因此在进行原位 RT-PCR 前用无 RNA 酶的 DNA 酶消化检测点和阴性对照点的内源性 DNA 是必要的。用

MG-63 细胞株作为成骨细胞模型,制备原位 RT-PCR 细胞涂片的最佳阶段是接种培养后第 9 天。归纳起来,我们认为:(1)人成骨肉瘤 MG-63 细胞株存在 ER α 和 ER β 基因的 mRNA 表达, MG-63 细胞株可作为研究雌激素作用的成骨细胞模型。(2)人成骨肉瘤 MG-63 细胞株 ER α 和 ER β 表达在 mRNA 水平存在差异, ER α 表达量比 ER β 丰富。这种不同可能反映两者在功能上的差异,推测介导成骨性基因表达增多的 ER 亚型主要是 ER α 。

【参 考 文 献】

- [1] Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science*, 1988, 241: 84-86.
- [2] Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, et al. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 5925-5930.
- [3] Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*, 1996, 392: 49-53.
- [4] Korach KS, Couse JF, Curtis SW, et al. Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes. *Recent Prog Horm Res*, 1996, 51: 159-188.
- [5] Windahl SH, Hollberg K, Vidal O, et al. Female estrogen receptor belth/-mice are partially protected against age-related trabecular bone loss. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 1388-1398.
- [6] Ernst M, Parker MG, Rodan GA. Functional estrogen receptors in osteoblastic cells demonstrated by transfection with a reporter gene containing an estrogen response element. *Mol Endocrinol*, 1991, 5: 1597-1606.
- [7] 罗湘杭, 廖二元, 周后德, 等. 雌二醇对人成骨样细胞基质金属蛋白酶及其抑制因子的作用. *中华内科杂志*, 2000, 39: 243-246.
- [8] Arts J, Kuiper G, Janssen J, et al. Differential expression of estrogen receptors α and β mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. *Endocrinology*, 1997, 138: 5067-5070.
- [9] Komminoth P, Long A. In situ polymerase chain reaction. An overview of methods, applications and limitations of a new molecular technique. *Virch Arch B*, 1993, 64: 67-73.
- [10] Komminoth P, Long A, Ray R, et al. In situ polymerase chain reaction detection of viral DNA, single copy genes and gene rearrangements in cell suspensions and cytopins. *Diagn Mol Pathol*, 1992, 1: 85-97.
- [11] Chen RH, Fuggle SV. In situ cDNA polymerase chain reaction. A novel technique for detecting mRNA expression. *Am J Pathol*, 1993, 143: 1527-1534.
- [12] Heniford B, Shum-Siu A, Leonberger M, et al. Variation in cellular EGF receptor mRNA expression demonstrated by in situ reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21: 3159-3166.
- [13] Martinez A, Miller MJ, Quinn K, et al. Non radioactive localization of nucleic acids by direct in situ PCR and in situ RT-PCR in paraffin embedded sections. *J Histochem Cytochem*, 1995, 43: 739-747.
- [14] Mee AP, Denton J, Hoyland JA, et al. Quantification of vitamin D receptor mRNA in tissue sections demonstrates the relative inefficiency of in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Pathol*, 1997, 182: 22-28.
- [15] Mee AP, Hoyland JA, Braidman IP, et al. Demonstrations of vitamin D receptor transcripts in actively resorbing osteoclasts in bone sections. *Bone*, 1996, 18: 295-299.
- [16] Hoyland JA, Mee AP, Baird P, et al. Demonstration of estrogen receptor mRNA in bone using in situ reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Bone*, 1997, 20: 87-92.
- [17] Lin S, Yamate T, Taguchi Y, et al. Regulation of the gp80 and gp130 subunits of the IL-6 receptor by sex steroids in the murine bone marrow. *J Clin Invest*, 1997, 100: 1980-1990.
- [18] Shankar VS, Simon BJ, Bax CM, et al. Effects of electromagnetic stimulation on the functional responsiveness of isolated rat osteoclasts. *J Cell Physiol*, 1998, 176: 537-544.

(收稿日期: 2005-05-10)

新 书 介 绍

《实用维生素矿物质安全手册》由周建烈医学博士和蔡美琴教授主编、陈君石研究员和陈孝曙研究员主审, 2005 年 9 月中国轻工业出版社出版, 定价 18 元。

全书共分四部分。第一部分总论: 包括维生素矿物质的危险度评定和各国营养素补充剂、维生素矿物质安全剂量的评定。第二部分各论: 详细介绍水溶性维生素、脂溶性维生素、常量元素和微量元素的毒理学研究(临床研究、动物实验、致癌性及致畸性)、维生素矿物质相互作用和政府营养权威机构的维生素矿物质摄入安全性的总评价。第三部分专题论文: 征集了一些维生素矿物质安全性纵向资料的专题论文, 第四部分附录: 介绍了缩略语对照表、中国和美国的维生素和矿物质膳食参考摄入量(DRIs)、维生素矿物质相互作用和影响表和中国营养素补充剂中维生素、矿物质的种类和用量表。

《实用维生素矿物质安全手册》综述了美国食品营养委员会(US FNB)、英国维生素矿物质专家组(UK EVM)和欧盟食品科学委员会(EC SCF)等政府营养权威机构的维生素矿物质安全性研究文献及相关的科学数据, 内容丰富, 资料新颖, 是一本对维生素矿物质安全性评估很有价值的参考资料。