·论著·

脂联素对人成骨细胞增殖作用的研究

袁凌青 罗湘杭 谢辉 郭丽娟 伍贤平 周后德 卢瑛 廖二元

摘要：目的 观察脂联素受体 1 和 2 mRNA 和蛋白在体外培养的人成骨细胞的表达及其对人成骨细胞的增殖作用，探讨脂联素对成骨细胞的作用机制。**方法** 分别用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测脂联素受体 1 和 2 mRNA 及蛋白的表达，^{3}H-TdR 和细胞计数检测脂联素对人成骨细胞增殖的作用。**结果** 人成骨细胞表达脂联素受体 1 和 2 的 mRNA，但只检测到脂联素受体 1 蛋白的表达，脂联素能够促进人成骨细胞增殖，并呈剂量依赖性。**结论** 脂联素对成骨细胞可能起旁分泌或内分泌作用。

关键词： 脂联素；成骨细胞；增殖

Adiponectin stimulates osteoblast proliferation *YUAN Lingqing, LUO Xianghang, XIE Hui, et al. Institute of Metabolism and Endocrinology, The Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha* 410011, China

Abstract: Objective To observe the mRNA expression of adiponectin receptors (AdipoR) 1 and 2 and protein in primary human osteoblast and to investigate the effect of adiponectin on osteoblast proliferation in rder to explain the mechanisms of adiponectin on osteoblast. **Methods** The expression of AdipoR 1 and 2 mRNA and protein was determined by RT-PCR and Western blot, and the proliferation of osteoblast was detected by ^{3}H-TdR and cell counter. **Results** Both AdipoR 1 and 2 mRNA were expressed in human osteoblast, but only AdipoR 1 protein could be examined in osteoblast. Adiponectin could promote the proliferation of osteoblast dose-dependently. **Conclusions** Adiponectin may be a paracrine or endocrine factor on osteoblast.

Key words: Adiponectin; Osteoblast; Proliferation

脂联素是一种新发现的脂肪细胞因子，由脂肪细胞特异性分泌。它由 244 个氨基酸组成，其氨基末端含有 1 个分泌信号序列，羧基末端有一个球蛋白的功能阈，属于含胶原样功能阈的蛋白家族。脂联素的生物学效应是通过脂联素受体（AdipoR）1 和 2 介导的[1]。最近的研究表明成骨细胞可表达脂联素及其受体，并且脂联素可影响骨代谢[2]，但其具体的作用机制尚未明确。

本研究观察了脂联素受体在人成骨细胞的表达和脂联素对成骨细胞增殖的影响，旨在探讨脂联素调节骨代谢的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 MEM 培养基、胰酶，EDTA、抗坏血酸、牛血清白蛋白（BSA）、Ⅳ型胶原酶购自 Sigma 公司，焦碳酸二乙酯（DEPC）、Trizol 购自 Invitrogen 公司，胎牛血清（FBS）购自 Hyclone 公司，逆转录试剂盒购自 Promega 公司，Taq 酶、琼脂糖、溴化乙锭购自上海生工公司，重组人脂联素构自美国 R&D 公司，抗人脂联素受体 1 和 2 购自美国 Phoenix 制药公司，^{3}H-TdR 购自中国科学院核物理研究所。ABI 3730 测序仪为上海博亚公司仪器。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人成骨样细胞的培养 外科手术取成人（30 ~ 50 岁无骨代谢疾病的骨折患者髂骨或股骨头）的松质骨 1 ~ 2 g，去除外膜结缔组织，剪成 2 mm^3 大小碎粒，PBS 冲洗 3 次，用 0.25% 胰酶-EDTA 37 ℃消化两次，每次 20 min，弃去消化液，继用 1 mg/mL Ⅳ型胶原酶于 37℃消化 5 次，反复振摇，每次 20 min，弃除前两次消化上清液，取最后 3 次消化液，离心（1200 r/min）10min，弃上清液后用含 15% 胎牛血清的 MEM 培养液重悬细胞，接种于 75 cm^2 培养瓶，于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养，次日换液弃去悬浮细胞，每隔两日换液 1 次 消化后的骨碎片可贴于 25 cm^2 培养瓶壁（25 ~ 40 个碎骨粒/瓶），加入含 15% FBS 的

作者单位：410011 长沙，中南大学湘雅二医院代谢内分泌研究所

通讯作者：廖二元，Email：eyliao2003@21cn.com

MEM培养液，37 ℃、5% CO_2 条件下培养，1 w后换液，以后隔两日换液1次，即得到酶消化法及骨片贴附法所获得成骨样细胞。用于观察矿化结节形成的细胞，于接种后第6 d开始，在上述MEM培养基中加入10 mmol/L β-甘油磷酸钠[3-5]。

1.2.2 培养细胞的鉴定

将培养细胞用PBS冲洗2次，Tris-Triton X-100（20 mmol/L Tris，2 mmol/L $MgCl_2$，150 mmol/L NaCl，1% Triton X-100）缓冲液加超声粉碎裂解细胞，裂解液离心后取上清，以α-磷酸奈酚为底物，日立7000型全自动生化分析仪测定细胞内碱性磷酸酶（ALP）活性（平均 *CV*4.2%）。按美国DiaSorin公司骨钙素放免试剂盒说明书测定培养上清中骨钙素（OC）含量，用^{125}I标记人骨钙素与骨钙素标准或培养上清液共同孵育，γ记数仪（中科院核物理研究所）测定上清液中的骨钙素含量，最小测定值为0.2 μg/L。用Bradford方法测出细胞内总蛋白含量，校正ALP和OC。矿化结节染色，细胞固定后，用0.1%茜素红染色5min，蒸馏水洗3次，乙醇脱水，镜下观察并摄像。

1.2.3 RT-PCR和免疫印迹检测人成骨细胞脂联素受体的表达

细胞用Trizol抽提总RNA，取1 μg总RNA用逆转录试剂盒合成cDNA，再在Gene Amp 2400 PCR扩增仪上行PCR，同时扩增AdipoR 1、2及内参基因β-actin。AdipoR 1正向引物：5′-CCCTGACTGGCTAAAGGACA-3′，反向引物：5′-CAGTACAGCCGCCTTCTAGG-3′，扩增产物为812 bp。AdipoR 2正向引物：5′-TTTGGAGCCCAGCTTAGAGA-3′，反向引物：5′-TAGCCAGCCTATCTGCCCTA-3′，扩增产物为796 bp。β-actin正向引物：CCTCGCCTTTGCCGATCC，反向引物：GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC，扩增产物为620 bp。扩增条件：[Mg^{2+}]1.5 mmol，退火温度60 ℃，35个循环。PCR产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色后拍照。为证实扩增特异性，PCR产物用3730测序仪直接测序。

Western杂交参照分子克隆操作[6]，取40 μg细胞总蛋白点样于8% SDS-PAGE胶电泳分离，电转至硝酸纤维素膜再用单克隆AdipoR 1和2抗体杂交，检测AdipoR 1和2蛋白质表达，ECL法显示免疫复合物。

1.2.4 细胞增殖试验

为研究脂联素对细胞数的影响，人成骨细胞按2×10^3/孔密度接种于96孔板，用重组脂联素3～30 μg/mL干预48 h。胰酶消化细胞，用0.04%台盼蓝染色计数有活力的细胞。

1.3 统计学处理

所有试验重复3次，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较用单因素方差分析。$P<0.05$ 有显著性差异。

2 结果

2.1 人成骨细胞鉴定

人成骨细胞能分泌ALP，分泌量为mU/mg蛋白，接种12 d后达到高峰，然后逐渐下降，ALP分泌峰值较刚接种时高3.74倍（68.9 ± 4.6 vs 18.4 ± 1.2）。人成骨细胞的培养上清液中能测出骨钙素，在接种后稍有升高[（3.5 ± 60.27 vs 4.13 ± 0.41）ng/mg蛋白]，6 d后又开始下降。人成骨细胞在抗坏血酸、β-甘油磷酸钠存在下，可使细胞外基质矿化，培养18 d可形成矿化结节，茜素红染色成红色（图1）。

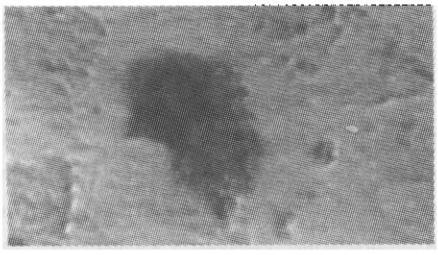

图1 人成骨细胞矿化结节茜素红染色
人成骨细胞在抗坏血酸、β-甘油磷酸钠存在下，培养18 d可形成矿化结节，茜素红染色呈红色

2.2 正常人成骨细胞表达脂联素受体

经过Ⅰ型胶原、碱性磷酸酶和矿化结节染色证实所培养细胞为成骨细胞。通过RT-PCT方法，AdipoR 1和2 mRNA在人成骨细胞均有表达。直接测序结果显示812 bp的基因序列为AdipoR 1，796 bp的基因序列为AdipoR 2（图1）。免疫印迹分析发现，人成骨细胞仅能检测到AdipoR 1（42 kDa）表达，而作为阳性对照的脂肪组织AdipoR 1的表达丰度较成骨细胞高（图2）。

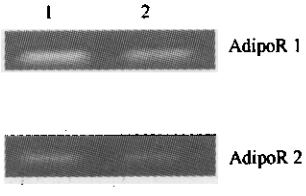

图2 脂联素受体1和2 mRNA在人成骨细胞的表达
注：1泳道为人皮下脂肪组织作为阳性对照；
2泳道为人成骨细胞

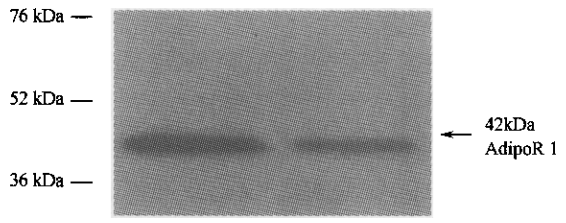

图 3 脂联素受体 1 蛋白在人成骨细胞的表达

注:1 泳道为人皮下脂肪组织作为阳性对照;2 泳道为人成骨细胞

2.3 脂联素促进成骨细胞增殖

通过细胞计数,3 ~ 30 μg/mL 的脂联素可增加成骨细胞数量,并呈剂量依赖性(图 4)。

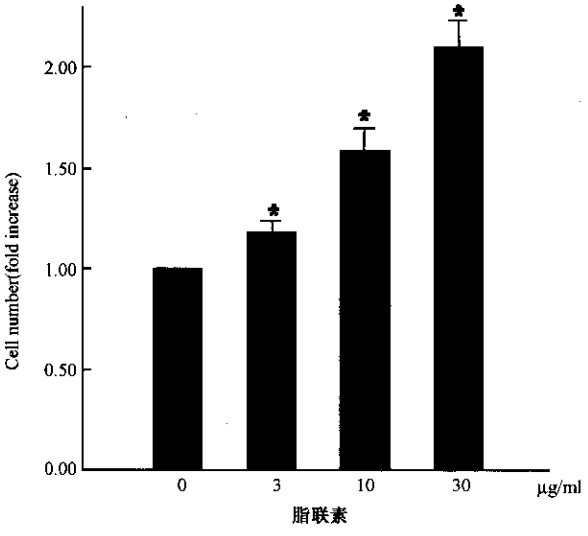

图 4 脂联素对人成骨细胞数的影响

注:分别用 0 ~ 30 μg/mL 脂联素干预人成骨细胞 48 h,脂联素显著促进成骨细胞增殖,并呈剂量依赖性,* $P < 0.05$

3 讨论

许多研究表明高体重指数对骨密度有保护作用[7-9],但其具体的机制尚未明确。目前提出由于肥胖引起的体重增加导致骨骼机械负荷增加,从而促进了骨代谢,另外脂肪细胞分泌的雌激素增加也可能参与了骨保护的作用。人们已经认识到脂肪组织是一种特殊的内分泌器官,脂肪细胞能够分泌几十种细胞因子,包括肿瘤坏死因子(TNF)-α,瘦素(leptin)等。研究表明部分脂肪细胞分泌的细胞因子可调节骨代谢。

脂联素最先在脂肪细胞分化克隆出来,Berner 等发现在成骨细胞中也有脂联素的表达[2]。脂联素的生理功能是通过脂联素受体两个亚型(AdipoR 1 和 2)介导的。AdipoR 1 主要在肌肉中表达,而 AdipoR 2 主要在肝脏表达。我们通过 RT-PCR 发现人成骨细胞可以表达 AdipR 1 和 2 的 mRNA,但 Western blot 仅检测到 AdipoR 1 蛋白的表达。RT-PCR 是将 mRNA 经逆转录后再用 PCR 特异性地扩增出 mRNA 的序列,RT-PCR 理论上可以检测到仅有数十个拷贝的基因。RT-PCR 所获得的产物经过测序直接证实了扩增的特异性。Western blot 结合了凝胶电泳分辨率高和固相免疫测定特异性敏感等优点,具有蛋白质反应均一性和敏感性高的特点,其检测蛋白质的敏感性为 1 ~ 5 ng。因此脂联素受体 mRNA 和蛋白在成骨细胞表达的不均一性可能是由于两种检测方法的敏感性不一致造成的,也有可能在翻译水平的差异所导致的。

Oshima 等发现脂联素能够抑制破骨细胞形成,提高成骨细胞碱性磷酸酶 mRNA 的表达,并且能够促进成骨细胞矿化,增加小鼠小梁骨骨量[10]。我们的研究发现脂联素促进人成骨细胞增殖,并呈剂量依赖性。这些研究表明,脂联素对骨代谢呈正性调节作用。但其作用的具体细胞信号途径尚待研究。

综上所述,我们在转录水平证实了人成骨细胞表达 AdipoR 1 和 2 的 mRNA,在翻译水平表达 AdipoR 1,并且脂联素能够促进人成骨细胞增殖,为脂联素直接调节成骨细胞提供了直接的证据。结合 Berner 等发现成骨细胞也可分泌脂联素[2],提示脂联素对成骨细胞可能起旁分泌或内分泌作用。

【 参 考 文 献 】

[1] Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. Nature, 2003, 423: 762-769.

[2] Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, et al. Adiponectin and its receptors and expressed in bone-forming cells. Bone, 2004, 35: 842-849.

[3] 梁敏,廖二元. 成人成骨细胞和 MG-63 细胞株孕激素受体的表达. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10: 412-414.

[4] Luo XH, Liao EY, Su X. Progesterone upregulates TGF-b isoforms (b1, b2, and b3) expression in normal human osteoblast-like cells. Calcif Tissue Int, 2002, 71: 329-334.

[5] Liao EY, Luo XH. Effects of 17 beta-estradiol on the expression of matrix metalloproteinase-1, -2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human osteoblast-like cell cultures. Endocrine, 2001, 15: 291-295.

[6] Sumbrook J, Fritsch EF, Maniatis T, et al. Molecular cloning laboratory manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989: 363-371.

(下转第 180 页)

（上接第 137 页）

[7] Castro JP, Joseph LA, Shin JJ. Differential effect of obesity on bone mineral density in White, Hispanic and African American women: a cross sectional study. Nutr Metab (Lond), 2005, 7: 9.

[8] Siris ES, Miller PD, Barrett-Connor E, et al. Identification and fracture outcomes of undiagnosed low bone mineral density in postmenopausal women: results from the National Osteoporosis Risk Assessment. Jama, 2001, 286: 2815-2822.

[9] Rico H, Arribas I, Casanova FJ, et al. Bone mass, bone metabolism, gonadal status and body mass index. Osteoporos Int, 2002, 13: 379-387.

[10] Oshima K, Nampei A, Matsuda M, et al. Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. Biochem Biophys Res Commun, 2005.331: 520-526.

（收稿日期：2005-06-20）