

17 β -雌二醇下调人成骨细胞 CTGF 表达的 信号转导机制研究

隋国良 彭依群 翟木绪 何玉玲 廖二元

摘要：目的 探讨 17 β -雌二醇下调人成骨细胞 CTGF 表达的信号转导机制。方法 人成骨细胞分别用 10⁻⁸ mol/L E₂ 及雌激素受体拮抗剂 ICI182780、PKA 阻断剂 H-89、PKC 阻断剂 H-7、NF- κ B 阻断剂 PDTC、PKA 活化剂 forskolin 干预 24 h 采用 Northern blotting、Western blotting 分析 CTGF mRNA、蛋白表达水平的变化。结果 10⁻⁸ mol/L 雌二醇可明显下调人成骨细胞 CTGF mRNA 及蛋白的表达 ,PKA 阻断剂 H-89 可完全阻断雌二醇对 CTGF 的降调节作用 ,而雌激素受体拮抗剂 ICI182780、PKC 阻断剂 H-7、NF- κ B 阻断剂 PDTC 对雌二醇介导的 CTGF 降调节无明显作用。PKA 活化剂 forskolin 可明显下调人成骨细胞 CTGF mRNA、蛋白的表达 ,雌二醇组与 forskolin 组相比 ,CTGF mRNA、蛋白的水平无明显差异。结论 17 β -雌二醇下调人成骨细胞 CTGF 表达由 PKA 介导 ,雌激素核受体、PKC、NF- κ B 信号转导通路均不参与雌激素介导的 CTGF 降调节。

关键词：17 β -雌二醇；结缔组织生长因子；成骨细胞

Study on mechanisms of inhibitory effect of 17 β -estradiol on connective tissue growth factor in human osteoblasts SUI Guoliang ,PENG Yiqun ,ZHAI Muxu ,et al. Institute of Metablism and Endocrinology , the Second Xiangya Hospital ,Central South University , Changsha 410011 ,China

Abstract: **Objective** To investigate the mechanisms involved in the inhibitory effect of 17 β -estradiol on connective tissue growth factor(CTGF) in human osteoblasts. **Methods** Human osteoblasts were exposed to 17 β -estradiol(10⁻⁸ mol/L) with or without estrogen nuclear receptor antagonist ICI182780 ,PKC antagonist H-7 ,PKA antagonist H-89 ,nuclear factor kappa B antagonist PDTC or PKA agonist forskolin for 24 hours. Northern and Western blot were used to detect the changes of CTGF. **Results** The expression of CTGF mRNA and protein were down regulated by 17 β -estradiol(10⁻⁸ mol/L) ,while this effect was abrogated by H-89 a PKA antagonist ,and no influence on this effect was observed with ICI182780 ,PKC antagonist H-7 and PDTC. Forskolin ,a PKA agonist , showed similar inhibitory effect as that of estradiol on the CTGF expression. **Conclusions** 17 β -estradiol inhibits the CTGF expression via PKA pathway in human osteoblasts.

Key words: 17 β -estradiol ; Connective tissue growth factor ; Human ; Osteoblast

结缔组织生长因子(connective tissue growth factor CTGF)是一个高度保守的肽类家族的成员 ,参与了体内多种生理和病理过程。有研究表明 ,CTGF 作为一种重要的效应分子之一 ,在软骨细胞和成骨细胞的增殖分化方面发挥重要作用^[1]。我们以前的研究发现 ,雌激素可呈时间-剂量依赖性下调人成骨细胞结缔组织生长因子 mRNA 的表达^[2,3] ,但雌激素下调

人成骨细胞 CTGF 表达的信号转导机制目前尚不清楚。本研究旨在探讨 17 β -雌二醇调节人成骨细胞 CTGF 表达的信号转导机制。

1 材料和方法

1.1 材料

雌二醇 ,无酚红 MEM 培养基 ,胰酶 ,EDTA ,抗坏血酸 ,牛血清白蛋白、H-89、H-7、PDTC 购自 Sigma 公司 ,焦碳酸二乙酯(DEPC) ,Trizol 购自 Invitrogen 公司 ,胎牛血清购自 Hyclone 公司 ,雌激素受体拮抗剂(ICI182780)购自英国 Tocris Cookson 公司 ,forskolin 购自 calbiochem 公司 ,逆转录试剂盒购自 Promega 公

基金项目：国家自然科学基金资助(30572078)

作者单位：410011 长沙 ,中南大学附属湘雅二医院代谢内分泌研究所(第一作者 现工作于烟台市烟台山医院)

通讯作者：廖二元 ,Email :eyliao1207@21.cn.com

司 α -³²P-dCTP 购自北京亚辉生物制品公司, CTGF 抗体购自 R&D 公司, β -actin 一抗、辣根过氧化物酶标记抗羊二抗购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

正常人成骨细胞培养:外科手术取正常成人髌骨松质骨,剔除周围结缔组织,剪成 2 mm³ 大小碎粒 PBS 冲洗摇荡 3 次,加入 1 mg/mL IV 型胶原酶 37℃ 震荡消化,待松质骨变白并呈蜂窝状,加入 20% FBS MEM 终止消化,10% FBS MEM 洗涤 3 次,待洗液中不含细胞时,将骨片贴于 25 cm² 培养瓶,加入 MEM 培养液(含 15% FBS、抗坏血酸 50 μ g/mL) 37℃ 5% CO₂ 培养。2 d 后换液,以后每 3 d 换液 1 次。培养约 15 d 后,可见细胞游出,约 25 d 达汇片,用 0.25% 胰酶-EDTA 消化,按 5 × 10⁵ 个细胞/25 cm² 培养瓶接种。

1.2.2 细胞干预实验

人成骨细胞接种于 25 cm² 培养瓶,10% FBS 无酚红 MEM 培养液培养,于第 2 d 换 0.1% BSA 无酚红 MEM 培养液培养 24 h 后,分别用 10⁻⁸ mol/L E₂ 及雌激素受体拮抗剂 ICI182780、PKA 阻断剂 H-89、PKC 阻断剂 H-7、NF- κ B 阻断剂 PDTC 干预 24 h,实验分为 6 组 (1)空白 (2)E₂ 10⁻⁸ mol/L (3)E₂ 10⁻⁸ mol/L + 雌激素受体拮抗剂 ICI182780 10⁻⁷ mol/L (4)E₂ 10⁻⁸ mol/L + H-750 μ mol/L (5)E₂ 10⁻⁸ mol/L + H-89 50 μ mol/L (6)E₂ 10⁻⁸ mol/L + PDTC 50 μ mol/L。24 h 后提取总 RNA 和蛋白质。此外,我们还观察了 PKA 活化剂 forskolin 对人成骨细胞 CTGF 表达的作用,实验分 3 组 (1)空白 (2)E₂ 10⁻⁸ mol/L (3) forskolin 10⁻⁵ mol/L 24 h 后提取总 RNA 和蛋白质。

1.2.3 Northern blot 检测人成骨细胞 CTGF mRNA 的表达

参照分子克隆实验指南进行操作。分别取对照组和实验组总 RNA 20 μ g,1.2% 甲醛琼脂糖变性胶电泳,转尼龙膜,将纯化回收的用 α -³²P-dCTP(北京亚辉)标记 cDNA 探针(β -actin 为内对照) 68℃ 杂交,2 × SSC/0.05% SDS 洗膜 15 min × 2 次,0.5 × SSC/0.5% SDS 50℃ 洗膜 15 min × 2 次,用 Typhoon 2000 Imagequant 5.1 成像分析系统扫描图像,并行条带光密度检测。

引物设计:用 PCR Designer 软件设计,引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

引物序列如下:正向 β -actin 5'-TCC TGT GGC

ATC CAC GAA ACT-3',CTGF 5'-CCA AGG ACC AAA CCC TGG T-3';反向 β -actin 5'-GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT-3',CTGF 5'-TAC TCC ACA GAA TTT AGC TCG-3'。

1.2.4 半定量 RT-PCR 检测成骨细胞 CTGF mRNA 的表达

用 Trizol 法按说明书抽提总 RNA。在 Gene Amp 2400 PCR 扩增仪上行半定量 RT-PCR。首先取总 RNA 2.0 μ g,用逆转录试剂盒,按说明书合成 cDNA,再取 cDNA 行 PCR 扩增。扩增体系:cDNA 50 ng,25mM MgCl₂ 2 μ L,100 ng/ μ L 引物各 0.7 μ L,10 × PCR buffer 2.5 μ L,Taq 酶 1 U,加去离子水至终体积 25 μ L。CTGF 扩增条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,最后 72℃ 延伸 7 min,循环 25 个。同时以 β -actin 基因作为内部质控。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统测定光密度,分别计算各基因与 β -actin 基因的光密度比值。

1.2.5 蛋白质抽提及 Western blot 分析

蛋白质的提取:倾去培养瓶中培养基,PBS 洗 2 次,每瓶加入三去污蛋白裂解液 400 μ L(50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),150 mmol/L NaCl,1% Triton X-100,0.2% NaN₃,0.5% 去氧胆酸钠,10 μ g/mL Aprotinin,1 μ g/mL PMSF),冰上放 20 min,用细胞刮刮取细胞,转移至 1.5 mL EP 管中。用 Bradford 法测蛋白含量后放 -70℃ 冰箱保存。

Western blot 分析参照分子克隆实验指南。取细胞 40 μ g 总蛋白与 4 × SDS 加样缓冲液混匀,95℃ 加热蛋白变性 5 min,点样于 10% SDS-PAGE 胶中电泳,转移至 PVDF 膜上。含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭 1 h 后,用含 CTGF 抗体(R&D 公司)的 PBS 温育 1 h,PBS 洗膜 5 min × 3 次,用含 1:2000 抗羊辣根过氧化物酶的 PBS 温育 1 h,洗膜后,ECL(Santa Cruz 公司)发光自显影,洗片显带。同一张膜洗脱后,用 1:1000 稀释的羊抗人 β -actin(Santa Cruz 公司)一抗,辣根过氧化物酶标记抗羊二抗(1:2000 稀释)(Santa Cruz 公司)重新杂膜,发光自显影,洗片显带作为内对照。所有杂交信号在成像分析仪系统测定条带光密度。

1.3 统计学方法

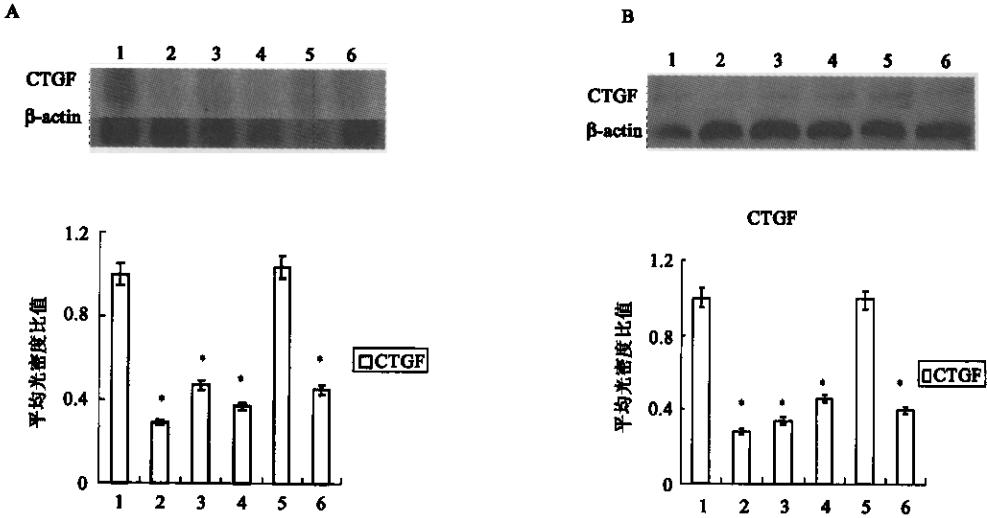
各实验独立重复 3 次,重复性好。所选图表为重复实验的结果之一。数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用方差分析。所有统计分析均采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 与空白对照组相比,10⁻⁸ mol/L 雌二醇可明显

下调人成骨细胞 CTGF mRNA 及蛋白(图 A 和 B)的表达 ($P < 0.01$) PKA 阻断剂 H-89 可完全阻断雌二醇对 CTGF 的降调节作用 雌激素受体拮抗剂 ICI182

780、PKC 阻断剂 H-7、NF- κ B 阻断剂 PDTC 对雌二醇介导的 CTGF 降调节无明显作用 ($P > 0.05$) ,见图 1。

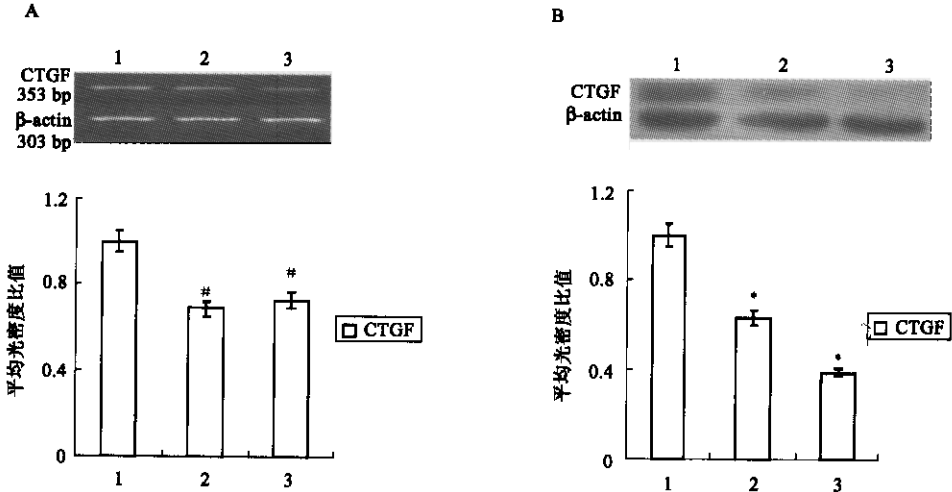


与对照组相比* $P < 0.01$; 1、2、3、4、5、6 分别表示空白对照组、 E_2 、 E_2 + ICI182780、 E_2 + H-89、 E_2 + H-7、 E_2 + PDTC; 平均光密度比值为 CTGF 光密度/ β -actin 平均光密度

图 1 雌激素及各种信号阻断剂对人成骨细胞 CTGF mRNA 和蛋白表达的影响

2.2 为进一步证实雌二醇下调 CTGF 的表达是由蛋白激酶 A 途径所介导 我们观察了蛋白激酶 A 激活剂 forskolin 对人成骨细胞 CTGF 表达的影响。我

们的研究结果显示 ,与空白对照组相比 ,雌二醇与 forskolin 均可明显下调人成骨细胞 CTGF mRNA(图 A) 蛋白(图 B)的水平 (P 分别 < 0.05 、 0.01)。



与对照组相比* $P < 0.01$; # $P < 0.05$; 1、2、3 分别表示空白对照组、 E_2 、forskolin; 平均光密度比值为 CTGF 光密度/ β -actin 平均光密度

图 2 雌激素及 forskolin 对人成骨细胞 CTGF mRNA 和蛋白表达的影响

3 讨论

结缔组织生长因子是 CCN 家族(为 CTGF、Cyr 61、NOV 第一个字母的缩写)的成员 ,是一种多功能

的生长因子 ,参与了体内多种病理生理过程 ,在胚胎发育、肿瘤形成、动脉粥样硬化、纤维化疾病及骨折愈合中发挥重要作用^[1]。Nishida 等研究发现 ,重组 CTGF 可促进 SaOS-2 细胞及 MC 3 T 3-E 1 细胞的增

殖,并上调骨基质蛋白如 I 型胶原、骨桥蛋白及碱性磷酸酶等 mRNA 的表达,提示 CTGF 具有促进成骨细胞增殖、分化的作用^[4]。提示 CTGF 可能在骨形成及骨代谢调控方面具有重要作用,并可能与骨质疏松症的发生有关。

有关 CTGF 基因表达调控的研究主要源于对 TGF- β 介导的纤维化疾病的研究,已证实人和小鼠的 CTGF 启动子区存在 TGF- β 调控元件。成纤维细胞中,CTGF mRNA 的表达主要受 TGF- β 的调控,TGF- β 短暂干预(1 h),即可诱导成纤维细胞持续表达高水平的 CTGF(24 ~ 36 h)。目前的研究认为,TGF- β 主要通过活化 smad 2/smud 3、PKC、P 42/P 44 MAPK 信号转导途径上调 CTGF 的表达^[5]。Suzuma 等^[6]发现 VEGF 可通过活化 PI₃ 激酶上调视网膜血管细胞 CTGF 表达,Riewald 等^[7]发现,活化的凝血因子 X 通过活化 NF- κ B 上调 HeLa 细胞 CTGF 的表达,而 Abraham 等^[8]则发现 TNF- α 可通过活化 NF- κ B 减低 TGF- β 对成纤维细胞 CTGF 的诱导作用;PGL₂ 类似物 iloprost、FSH、LH 均可通过活化 PKA 下调 CTGF 的表达^[9,10],Fan 等^[11]则发现活化 PKC 可抑制 CTGF 的表达。Pereira 等^[12]对小鼠成骨细胞 CTGF 基因表达调控研究发现,糖皮质激素可上调 CTGF mRNA 的表达。

新近我们采用 cDNA RDA 联合 cDNA 阵列点杂交方法观察到,17 β -雌二醇可明显下调人成骨样 MG 63 细胞 CTGF mRNA 的表达,我们应用 RT-PCR 和 Northern blot 方法进一步证实 17 β -雌二醇下调人成骨细胞 CTGF mRNA 的表达作用呈明显时间-剂量依赖性,但其具体信号转导途径尚不清楚^[2,3]。目前认为雌激素通过两条途径来发挥其生物学效应,一条是依赖经典的核受体途径的基因组效应,另一条是依赖膜受体途径的非基因组效应。在本研究中我们分别应用雌激素受体拮抗剂 ICI 182780、PKA 阻断剂 H-89、PKC 阻断剂 H-7、NF- κ B 阻断剂 PDTC 阻断雌激素不同的信号转导途径,结果发现阻断 ER、PKC、NF- κ B 后,并未解除 17 β -雌二醇对 CTGF mRNA 表达的下调作用,表明雌激素下调 CTGF 表达既非通过核受体途径,也并不是由 PKC 或 NF- κ B 所介导;阻断 PKA 信号转导途径则可解除雌激素对 CTGF 表达的下调作用,应用 PKA 激活剂 forskolin 可模拟雌激素作用下调 CTGF 表达,提示雌激素主要通过活化 PKA 下调人成骨细胞 CTGF 的表达。

总之,通过本研究我们发现,17 β -雌二醇可下调

人成骨细胞 CTGF mRNA 和蛋白的表达,17 β -雌二醇主要通过活化蛋白激酶 A 途径下调人成骨细胞 CTGF 的表达。但 CTGF 表达下调是否参与雌激素介导的骨保护作用目前尚不清楚,下一步我们将研究 CTGF 表达下调在人成骨细胞所引起生物学效应,以期阐明 CTGF 在骨代谢调控中的作用。

【参 考 文 献】

- [1] Brigstock DR. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocrine Reviews*, 1999, 20: 189-206.
- [2] 彭依群,廖二元,邓小戈. 雌二醇诱导人成骨样细胞差异表达基因筛选. *中华内科杂志*, 2003, 42: 561-565.
- [3] 翟木绪,彭依群,隋国良,等. 17 β -雌二醇对体外培养人成骨细胞 CTGF 和 PAIP-1 基因表达的作用. *中国骨质疏松杂志*, 2005, 11: 25-37.
- [4] Nishida T, Nakanishi T, Asano M, et al. Effects of CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, on the proliferation and differentiation of osteoblastic cells *in vitro*. *J Cell Physiol*, 2000, 184: 197-206.
- [5] Chen Y, Blom IE, Sa S, et al. CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC. *Kidney Int*, 2002, 62: 1149-1159.
- [6] Suzuma K, Naruse K, Suzuma I, et al. Vascular endothelial growth factor induces expression of connective tissue growth factor via KDR, Flt1, and phosphatidylinositol 3-kinase-akt-dependent pathways in retinal vascular cells. *J Biol Chem*, 2000, 275: 40725-40731.
- [7] Riewald M, Kravchenko VV, Petrovan RJ, et al. Gene induction by coagulation factor Xa is mediated by activation of protease-activated receptor 1. *Blood*, 2001, 97: 3109-3116.
- [8] Abraham DJ, Shiwen X, Black CM, et al. Tumor necrosis factor- α suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor- β in normal and scleroderma fibroblasts. *Biol Chem*, 2000, 275: 15220-15225.
- [9] Stratton R, Rajkumar V, Ponticos M, et al. Prostacyclin derivatives prevent the fibrotic response to TGF- β by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway. *The FASEB J*, 2002, 16: 1949-1951.
- [10] Liu J, Kosma VM, Vanttinen T, et al. Gonadotrophins inhibit the expression of insulin-like growth factor binding protein-related protein-2 mRNA in cultured human granulosa-luteal cells. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8: 136-141.
- [11] Fan WH, Kamovsky MJ. Activation of protein kinase C inhibits the expression of connective tissue growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 275: 312-321.
- [12] Pereira RC, Durant D, Canalis E. Transcriptional regulation of connective tissue growth factor by cortisol in osteoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000, 279: E570-E576.