

胰岛素和 IGF-1 对成骨样细胞 MG63 I 型胶原基因表达的影响

马艳芬 李万根 陈澍

摘要：目的 应用胰岛素(INSU)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)干预体外培养的人成骨样细胞 MG 63，并以 17-雌二醇(E_2)做阳性对照。观察药物干预对 MG 63 细胞 I 型胶原(COL1)表达的影响。方法用 DMEM 培养基培养 MG 63 细胞，并以 INSU、IGF-1、 E_2 进行干预。抽提各样本总 RNA 后，行逆转录并对 COL1 的 cDNA 进行荧光扩增和定量。结果 各药物组内基因拷贝数(COPY)均有统计学差异($P < 0.05$)，各组药效呈浓度依赖性增加趋势。在本实验所选的药物浓度范围内，INSU、IGF-1、 E_2 各药物组的最高药效浓度均为本实验所用的最高药物浓度，分别为 2×10^{-7} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L。3 组间有统计学差异($P < 0.05$)，INSU 和 IGF-1 组 COPY 增长率明显大于 E_2 组，INSU 和 IGF-1 组比较无统计学差异。结论 INSU、IGF-1 和 E_2 一样，均有显著促进 MG 63 分化的作用。

关键词：胰岛素；IGF-1；MG 63 细胞；分化

Effect of insulin and IGF-1 on expression of type I collagen of human osteosarcoma cell line MG 63 MA Yanfen, LI Wangen, CHEN Shu. Department of Endocrinology, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College. Corresponding author: MA Yanfen, E-mail: lilymyf@sohu.com (Department of Endocrinology, Daxing Hospital, Beijing 102600, China)

Abstract : **Objective** To investigate the effect of insulin(INSU) and insulin like growth factor- I (IGF- I) on the expression of type I collagen(COL1) with positive of 17- β estradio(E_2) and to explore the pathogenesis of the osteoporosis. **Methods** MG 63 cell(10^5 /mL) were cultured in the DMEM medium and exposed to INSU ,IGF-1 or E_2 for 48 hours with 0.1% bovine serum albumin phenol-free DMEM. The total RNA of each sample was extracted and reverse transcriptions was performed to get the cDNA chains of COL1. Fluorescence real time quantitative PCR assay was carried out to examine the mRNA expression of COL1. The nest primers were used in the PCR assay. ANOVA and post hoc analysis were performed in SPSS 11.0 software. **Results** The expression of mRNA for COL1 was significantly different among the three groups ($P < 0.05$) and the effect of each medication increased dose-dependently. The most significant effect was observed at the highest concentration of each medication applied in this study(INSU 2×10^{-7} mol/L, IGF-1 10^{-7} mol/L and 17- β estradiol 10^{-6} mol/L). The increase rates of COL1 mRNA in INSU , IGF-1 group was significantly higher than that of E_2 group ($P < 0.05$), but not between the groups of INSU and IGF-1 ($P < 0.05$). **Conclusions** INSU and IGF-1 can improved the differentiation of MG 63 as E_2 .

Key words : Insulin ; IGF-1 ; MG 63 cell ; Differentiation

随着人类进入老年化社会，骨质疏松(osteoporosis, OP)的发病率逐年增高。骨质疏松是以低骨量和骨的微细结构破坏为特征，导致骨强度

降低，骨脆性增加，容易发生骨折的一种全身性代谢性骨病。实验证明胰岛素样生长因子-1(IGF-1)可使大鼠的 I 型胶原蛋白(COL1)、碱性磷酸酶 mRNA 表达明显增强^[1]。Kim 用不同浓度的 INSU 干预成骨细胞系，发现其胶原水平呈剂量依赖性增加，在 10^{-7} mol/L 浓度时检测其胶原增加量为 50%。而 IGF-1 与胰岛素原有 60% 的结构同源性且具有胰岛素(INSU)样作用^[2]，此研究通过对 COL1 α_1 链的基

基金项目：广东省自然科学基金资助项目(000333)

作者单位：510182 广州，广州医学院第二附属医院内分泌科
(第一作者现工作单位：102600 北京市大兴区人民医院内分泌科)

通讯作者：马艳芬，Email: lilymyf@sohu.com

因扩增,观察 IGF-1、INSU 对人成骨样细胞 MG 63(简称 MG 63 细胞) COL1 表达的影响,并以 17-雌二醇(E_2)做阳性对照,探讨骨质疏松的发生机制并观察 INSU 这一糖尿病的常用药物及 IGF-1,是否与 E_2 一样具有保护骨量的作用,为骨质疏松尤其是糖尿病性骨质疏松的治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和药物干预

MG 63 细胞(美国 ATCC)以无酚红的 10% FBS 的 DMEM 培养基(Invitrogen 公司)培养于 5% CO_2 ~ 95% 空气、饱和湿度、37℃ 的 CO_2 培养箱中,3 d 传代 1 次。以每孔 $2.5 \times 10^4/mL^{[3]}$ 的浓度将 MG 63 细胞接种于 6 孔培养板中。24 h 换以无血清培养基,将 4 种浓度的 INSU(Lily 公司)、IGF-1(Sigma 公司)、 E_2 (Sigma 公司)分别加入 6 孔板中,各药物干预 MG 63 浓度(单位均为 mol/L)分别为 INSU 0, 10^{-8} , 5×10^{-8} , 2×10^{-7} ; IGF-1: 0, 10^{-9} , 2×10^{-8} , 10^{-7} ; E_2 : 0, 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-6} 。分别以 C1, C2, C3, C4 表示,其中 C1 组为空白对照(CON)。继续培养 48 h,消化后抽提细胞总 RNA。

1.2 细胞总 RNA 的提取和鉴定

用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司)依次提取出各样本的总 RNA。取 50 μL 各样本总 RNA,用分光光度计测定总 RNA 260 nm 和 280 nm 的吸光度值,计算两者比值。另取 5 μL 各样本总 RNA 置琼脂糖凝胶上电泳,染色后置紫外灯下观察 RNA 的完整性。

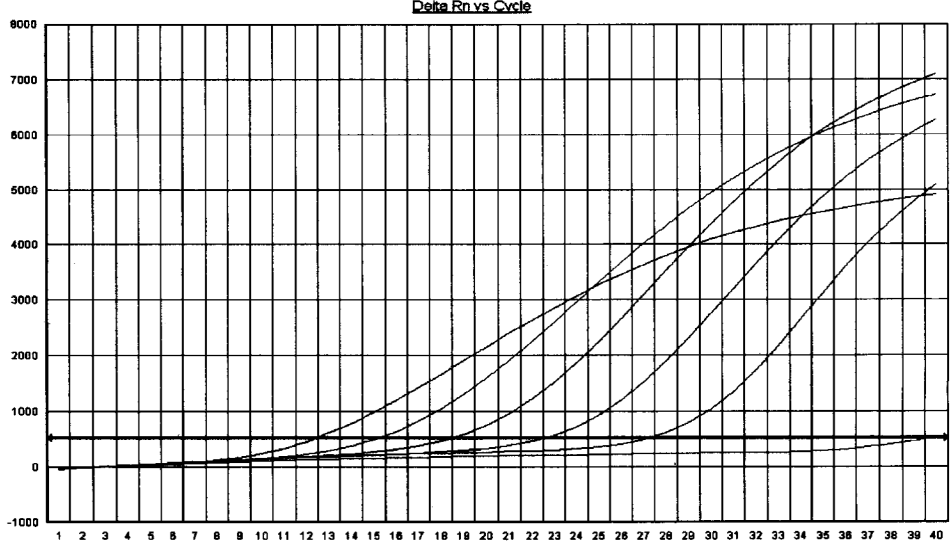
1.3 标准曲线的建立及 COL1 mRNA 的实时荧光定

量 PCR 测定

根据目的基因 COL1 α_1 和管家基因 GAPDH 的 cDNA 序列,设计并合成引物及探针(广州中山大学达安基因公司),COL1 α_1 采用巢式引物,COL1 α_1 -1 为外围引物,COL1 α_1 -2 为基本引物。其引物和 TaqMan 探针序列分别为:COL1 α_1 -1 前向引物 5'-ACCTCA-AGATGTGCCACTCT-3', COL1 α_1 -1 逆向引物 5'-TAC-ACGCAGGTCTCACCAGT-3', 扩增产物为 121 bp; COL1 α_1 -2 前向引物 5'-TGGAAGAGTGAGAGTAC-TGGATTG-3', COL1 α_1 -2 逆向引物 5'-CCATGTTGCA-GAAGACTTTGATG-3', 扩增产物为 76 bp, TaqMan 探针 5'-FAM-CCAACCAAGGCTGCAACCTGGA-TAMRA-3' (22 bp); GAPDH 前向引物 5'-CCATCAATGACC-CCTTCATTG-3', 逆向引物 5'-CATGGGTGGAATCAT-ATTGGAAC-3', 扩增产物为 65 bp, FAM-MGB 探针 5'-CCTCAACTACATGGTTTAC-3' (19 bp)。另外,以 GAPDH 做阳性对照,阴性对照(NEGA)体系中不加模板 DNA,采用灭菌双蒸水。

取各样本的总 RNA 模板 8.5 μg ,用德国 Qiagen 公司的 PE 9600 PCR 仪行逆转录反应,逆转录试剂盒购自 ABI 公司。反应完毕后,取 COL1 的 cDNA 5 μL 进行普通 PCR 扩增(Taq 酶购自 ABI 公司)。产物用回收试剂盒(ABI 公司)进行回收纯化后,做梯度稀释,制备成阳性定量标准品,浓度分别为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 。取 5 μL 标准品进行荧光扩增和定量,电脑自动作出标准曲线(图 1)。

首先取各样本 COL1 cDNA 5 μL 进行巢式反映体系的外扩增,应用普通 PCR 方法,引物为 COL1 α_1 -1



示阳性标准品的 COPYS 与 CT 值的关系(相关系数 $r = 0.997$)

图 1 标准曲线

前向引物和 COL1 α_1 -1 逆向引物,共 20 个循环。取外扩增产物 5 μ L, COL1 α_1 -2 前向引物, COL1 α_1 -2 逆向引物, 及 TaqMan 探针行巢式反映体系的内扩增(荧光定量 PCR),反应条件:93 $^{\circ}$ C 2 min,然后 93 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,共 40 循环。此反应体系连同 5 个浓度的阳性定量标准品及 NEGA 组一放入 7000 型荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司生产)的相应孔内进行荧光定量扩增,每样本作 3 遍。反应结束后,由电脑自动分析并计算出各样本的基因拷贝数(COPYS)。GAPDH mRNA 的荧光定量 PCR 的反映体系和条件基本同巢式反映体系的内扩增。

1.4 统计学分析

用 SPSS11.0 软件进行统计分析及作图。所有数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。用各样本 COPYS/GAPDH mRNA COPYS 的结果参与各药物组内及组间的比较。采用随机区组设计方差分析进行统计学处理。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

各样本 OD 260/OD 280 的均数为 1.904。总 RNA 样本经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离后,可见 28 s 和 18 s 两条带的荧光强度比值为 2:1。在荧光 PCR 仪中扩增后各样本的荧光定量反应曲线如图 2。NEGA 组曲线几乎与基线平行,说明体系中不存在 PCR 污染。

检测结果显示:INSU 组内由高到低的不同药物浓度间 COL1 mRNA COPYS 有显著差异(P 均 < 0.05);在达到最高药效浓度前,其 mRNA COPYS 随

药物浓度的增加而呈逐渐增加趋势。IGF-1、E₂ 各药物组的变化趋势及对比关系与 INSU 组相同。在本实验所选的药物浓度范围内,各药物组的最高药效浓度均为本实验所用的最高药物浓度,分别为 INSU 2×10^{-7} mol/L、IGF-1 10^{-7} mol/L、E₂ 10^{-6} mol/L,见表 1。

表 1 不同药物组各药物浓度间 COL1 mRNA COPYS 的变化

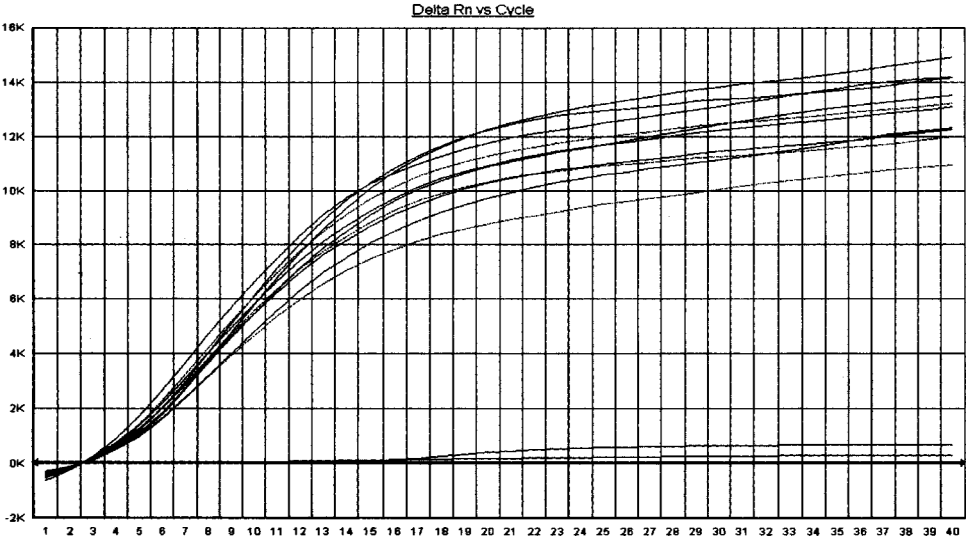
组别	药物浓度			
	C1(CON)	C2	C3	C4
INSU	159610 $\pm$ 3706 *	187809 $\pm$ 8611 * *	203916 $\pm$ 1000 * *	289632 $\pm$ 0.000 *
IGF1	159610 $\pm$ 3706 *	161746 $\pm$ 4416 *	179228 $\pm$ 17947 * *	292918 $\pm$ 4986 *
E ₂	159610 $\pm$ 3706 *	163492 $\pm$ 2067 *	198185 $\pm$ 28628	233738 $\pm$ 2394 *

注:与 CON 组比较 * $P < 0.05$;与 C4 组比较 * $P < 0.05$

计算不同药物干预后 COL1 mRNA COPYS 的增长率。mRNA COPYS 的增长率(%) = (最高药效浓度组 - CON)/ CON(COPYS);INSU、IGF-1、E₂ 3 组的增长率分别为 $81.8 \pm 4.6\%$, $83.5 \pm 5.1\%$ 、 $46.3 \pm 35.2\%$,3 组间有统计学差异($P < 0.05$),INSU 和 IGF-1 组 COPYS 增长率明显大于 E₂ 组,INSU 和 IGF-1 组比较无统计学差异。

3 讨论

COL1 约占骨有机成分的 80% ~ 90%,它对维持骨结构的完整及骨生物力学特征非常重要。胶原蛋白结构及数量的改变与骨质疏松的发生发展关系密切。本实验应用实时荧光定量 PCR 法及外标准曲线检测 MG 63 的 COL1 mRNA,可根据标准曲线计算出该样本的起始拷贝数,使产物量与扩增初始模板量之间存在的良好的量-效关系,以比较不同药物干预



上面较集中的 10 条曲线为各药物干预组及 CON 组的 COL1 mRNA 扩增曲线,下面依次为 GAPDH 对照组及 NEGA 组

图 2 各样本 COL1 扩增曲线

对成骨样细胞 MG 63 分化的影响。其敏感性和特异性均明显优于传统的斑点杂交、Northern blot 及普通 RT-PCR 等方法。标准曲线以 5 条以上为最好,且应有阴性对照(NEGA 组)^[4]。巢式引物对目的基因进行两次扩增而得到终产物,明显增加了实验的敏感性和特异性。每对引物所扩增的序列均至少跨越两个外显子,可排除基因组 DNA 的污染。由于本研究目的是比较转录水平(mRNA)的差异,因此需要检测样本的管家基因的相对数量,用来把目的基因归一化^[5]到相同细胞数的比较。实验得出的各样本的扩增曲线光滑,一致系数接近 1.000,结果较理想。

研究结果显示,INSU、IGF-1、E₂ 各药物组内 COL1 mRNA COPYs 从低浓度至最佳药物浓度组,其数量随药物浓度的增加而呈逐渐增加趋势,其量效呈线性关系。3 药物组间 COL1 基因的 COPYs 增长率比较无统计学差异。本实验的最高药效浓度均为本实验的最高药物浓度,这提示,如果再增加药物浓度,可能最高药效浓度会随之改变;其量效关系曲线可能有几种趋势,既随浓度的增加呈直线上升趋势、抛物线下降趋势、平台趋势等,这些均需在以后的实验中进一步探讨,但无论以后的结果如何,本实验的结果均能提示,胰岛素、IGF-1 和雌二醇一样均有促进 MG 63 细胞分化的作用,且在一定浓度范围内,COL1 mRNA 拷贝数从低浓度至高浓度组,其数量随药物浓度的增加而呈逐渐增加趋势,其量效呈线性关系。Langdahl 等^[6]应用 IGF-1 对体外培养的人类成骨细胞进行干预。结果发现,IGF-1 有不同程度的促进成骨细胞分化的作用,并呈剂量依赖性。此结果与本研究的结果相仿。

本实验选用的人成骨肉瘤细胞系 MG 63(human osteosarcoma cell line MG 63, MG 63)是已公认的近 10 种永久性成骨样细胞系中的一种,具有成骨样细胞的大部分特征,可用于基础研究及药效观察等。在药物选择方面,本研究参考国内外文献^[7,8],确定各种药物的干预剂量。IGF-1 用于成骨细胞方面的研究较多,其剂量从 $10^{-9} \sim 10^{-7}$ mol/L 不等^[9,10,6]。关于 E₂ 的浓度,Cheng 等^[11]发现在 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ M 浓度时,E₂ 对成骨细胞的作用最强,与本实验结果相符。纵观近十年来国内外在此领域的研究,用

INSU 作为成骨细胞的干预药物的报道甚少。本文采用了 INSU 作为干预药物,主要考虑到大量糖尿病性骨质疏松患者的治疗,且首次在转录水平发现 INSU 有促进成骨样细胞分化的作用,证实了 INSU 这一来源方便、费用经济、副作用少的生物性制剂和 IGF-1 均具有与 E₂ 相同的促进成骨样细胞分化的作用,为骨质疏松特别是糖尿病性骨质疏松的治疗提供了理论基础和实验依据。

【参 考 文 献】

- [1] Tanaka H, Wakisaka A, Ogasa H. Effect of IGF-1 and PDGF administered *in vivo* on the expression of osteoblast-related genes in old rats. *J Endocrinol*, 2002, 174:63-67.
- [2] 王宗辉,许樟荣,宋淑军. 糖尿病的临床表现及影像学特点. *中国糖尿病杂志*, 1998, 6:230-231, 233.
- [3] Milne M, Quail JM, Clifford J, et al. Insulin growth factor binding proteins in femoral and vertebral bone marrow stromal cells: expression and regulation by thyroid hormone and dexamethasone. *J Cellular Biochem*, 2001, 81:229-240.
- [4] Tobisten S, Koburger T, Jurgen B, et al. Quantification of Bacterial mRNA by One-Step RT-PCR Using the LightCycler System. *Biochemica*, 2003, 3:.
- [5] 张馨. 荧光实时定量 PCR 技术初探. *生命科学趋势*, 2003, 1(4):1-28.
- [6] Langdahl BL., Kassem M, Moller MK, et al. The effect of IGF-1 and IGF-2 on proliferation and differentiation of human osteoblast and interactions with growth hormone. *Euro J Clin Invest*, 1998, 28:176-183.
- [7] Qutob S, Dixon SJ, Wilson JX. Insulin stimulates vitamin C recycling and ascorbate accumulation in osteoblastic cells. *Endocrinology*, 1998, 139(1):51-56.
- [8] Kim SJ, Chun JY, Kim MS. Insulin stimulates production of nitric oxide via ERK in osteoblast cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 278:712-718.
- [9] Rydziel S, Delany AM, Canalis E. Insulin-like growth factor I inhibits the transcription of collagenase 3 in osteoblast cultures. *J Cell Biochem*, 1997, 67:176-183.
- [10] Jia DA, Heersche JNM. Insulin-like growth factor-1 and 2 stimulate osteoprogenitor proliferation and differentiation and adipocyte formation in cell populations derived from adult rat bone. *Bone*, 2000, 6:785-794.
- [11] Cheng MZ, Simon CF, Rawlinsine, Andrew A, et al. Human osteoblast proliferative responses to strain and 17 β -estradiol are mediated by the estrogen receptor and the receptor for insulin-like growth factor I. *J Bone and Mineral Research*, 2002, 17:593-602.

(收稿日期: 2006-02-06)