

依普拉芬对新生大鼠颅盖骨成骨细胞 BMP-2 和 TGF- β_1 mRNA 表达的影响

葛保健 王永清 刘江涛 夏仁云

摘要：目的 研究依普拉芬对体外培养的原代大鼠成骨细胞 BMP-2 (Bone Morphogenic Protein-2 ,骨形态发生蛋白-2)和 TGF- β_1 (Transforming Growth Factor- β_1 ,转化生长因子- β_1)mRNA 表达的影响,探讨其预防绝经后骨质疏松的机制。方法 体外分离培养新生大鼠颅盖骨成骨细胞,取第二代细胞,将不同浓度的依普拉芬加入培养液,72 h 后用 RT-PCR 技术检测各组细胞 BMP-2 和 TGF- β_1 mRNA 表达情况。结果 与阴性对照组比较,各浓度组的依普拉芬均可使成骨细胞 BMP-2 和 TGF- β_1 mRNA 表达量显著增加($P < 0.01$),其中,依普拉芬浓度在 $10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L 之间作用最为显著。结论 $10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L 浓度范围内的依普拉芬均可促进成骨细胞 BMP-2 和 TGF- β_1 mRNA 的表达,从而间接促进其增殖和分化,增加骨形成。

关键词：依普拉芬；成骨细胞；BMP-2；TGF- β_1 ；逆转录 PCR

Effect of Ipriflavone on mRNA expression of BMP-2 and TGF- β_1 of cultured rat osteoblast *in vitro* GE Baojian, WANG Yongqing, LIU Jiangtao, et al. Department of Orthopaedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract : Objective To study the effects of Ipriflavone (7-isopropoxyisoflavone, IP) on mRNA expression of BMP-2 (Bone Morphogenic Protein-2) and TGF- β_1 (Transforming Growth Factor- β_1) in cultured rat osteoblast *in vitro*. **Methods** New born rat calvarial osteoblastic cell was isolated and cultured with the medium containing Ipriflavone of different concentration. After 72 hours, the mRNA expression of BMP-2 and TGF- β_1 were examined by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** In comparison with controls, Ipriflavone induced a significant increase in the levels of BMP-2 and TGF- β_1 mRNA ($P < 0.01$). $10^{-8} \sim 10^{-5}$ mol/L Ipriflavone had more significant effects than other concentration. **Conclusions** Ipriflavone could increase significantly the expression levels of BMP-2 and TGF- β_1 mRNA in cultured rat osteoblast *in vitro*. Thus it could promote the proliferation and differentiation of cultured rat osteoblast *in vitro*.

Key words : Ipriflavone ; Osteoblast ; BMP-2 ; TGF- β_1 ; RT-PCR

异黄酮是一类存在于多种植物的类固醇,具有弱雌激素样作用,通常被称为植物雌激素。近年来的研究表明,大豆异黄酮在细胞培养及动物实验和人群调查中对骨代谢及预防骨质疏松有重要作用,其发挥作用的机制仍在探讨中。已经有报道证实,人工合成的异黄酮类物质——依普拉芬可用于预防由于雌激素缺乏引起的绝经期妇女以及去卵巢大鼠的骨量丢失^[1]。但是关于其作用的具体机制目前还

不十分清楚。笔者研究依普拉芬对体外培养的原代大鼠成骨细胞 BMP-2 和 TGF- β_1 mRNA 表达的影响,探讨其预防绝经后骨质疏松的细胞作用机制。

1 材料和方法

1.1 试剂

DMEM 培养基(Hyclone 公司),胎牛血清(Gibco 公司),胰蛋白酶、II 型胶原酶、琼脂糖粉剂、MTI(噻唑盐)、二甲基亚砜(DMSO)(Amersco 公司),碱性磷酸酶活性试剂盒(南京建成生物技术公司),依普拉芬原料(华中科技大学同济医学院药学院石朝周教授惠赠)纯度 $> 99.8\%$, TRIZOL(Invitrogen 公司),

作者单位: 221002 徐州医学院附属医院骨科(葛保健); 华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科(王永清、刘江涛、夏仁云)

通讯作者: 葛保健, Email: gbjly81@sina.com

MMLV 逆转录酶(Promega 公司), OligodT 15(Sabc 公司) RNasin(华美公司), dNTPs(Roche 公司), Taq DNA 聚合酶(晶美生物技术公司), DEPC(TBD 公司产品), 100 bp DNA Ladder(北京中山生物技术有限公司), 引物合成由北京赛百胜生物工程公司合成, 引物序列如下:

TGF- β_1 : Sense: 5'-AGACGAATTCATGGCCCTGGA-TACC-3'

Antisense: 5'-AGACGGATCCTCAGCTGC-ACTTGCAGG-3' 产物长度 341 bp

BMP-2: Sense: 5'-ACGATGCCGCCATTGTG-3'

Antisense: 5'-CGCCTCGCCTTCTTCAGT-3' 产物长度 349 bp

β -actin 内参照引物序列: Sense: 5'-ATG TTT GAG ACC TTC AAC AC-3'

Antisense: 5'-CAC GTC ACA CTT CAT GAT GG-3' 产物长度 489 bp

1.2 新生大鼠颅骨成骨细胞的分离、培养、纯化及鉴定

取 10 只新生 SD 大鼠(24 h 以内, 由湖北中医学院实验动物中心提供) 处死, 置 75% 乙醇中浸泡 10 min, 揭去头顶皮肤, 剥出头盖骨, 仔细刮除附着的骨膜、血管等结缔组织, D-Hank's (pH 7.2) 洗涤数次, 用眼科剪剪成约 1 mm $\times$ 1 mm 的小片, 然后将小骨片转入 5 ml 含 0.25% 胰蛋白酶的消化液中, 37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 20 min, 短暂离心, 弃去胰蛋白酶溶液。再次用 D-Hank's 清洗骨片 2 次, 转入 5 ml 0.1% II 型胶原酶中, 37 $^{\circ}$ C 振荡消化 90 min, 吸取消化液, 1000 r/min 离心 8 min, 收集消化液内所释放的细胞。用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液悬浮细胞, 计数并调整细胞浓度后种植于 50 ml 培养瓶中。15 min 后, 轻轻吸取细胞悬液, 转至另外一个培养瓶中, 反复 3 次, 根据差速黏附原理去除成纤维细胞以纯化成骨细胞。最后置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养, 观察细胞生长情况, 待细胞融合后消化, 进行传代实验。Gomori 钙钴法进行 ALP 染色, 茜素红法进行矿化节染色, 鉴定为成骨细胞, 取第二代细胞进行实验。

实验分组: 将依普拉芬原料用 DMSO 溶解, 然后用含 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液配制成为 10⁻¹⁰、10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ 和 10⁻⁵ mol/L 各浓度组备用。取生长良好的第二代细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 以 1 $\times$ 10⁴/ml 接种于 24 孔培养板, 48 h 后, 观察细胞生长良好, 将培养液换成 ① 阴性对照组: 1% 胎牛血清的 DMEM 培养液; ② 阳性对照组: 10% 胎牛

血清的 DMEM 培养液; ③ 实验组: 上述各种浓度的依普拉芬。每组设 6 个复孔。

1.3 各组细胞 BMP-2 和 TGF- β_1 mRNA 的检测

1.3.1 细胞总 RNA 的提取: 将上述各组细胞培养 72 h 后, 吸去各孔培养液, 用磷酸缓冲液 (phosphated buffered saline PBS) 冲洗, 然后用 TRIZOL 一步法提取各组细胞总 RNA (具体步骤按 TRIZOL 操作说明书进行) 检测各组总 RNA 浓度及纯度, 置 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.3.2 cDNA 的合成: 根据所测 RNA 的浓度, 各组取 2 ~ 10 μ g 在 70 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 置冰浴 3 min, 分别加入如下反应体系: 5 $\times$ buffer (逆转录酶) 4 μ l, dNTPs (10 mmol/L) 0.1 μ g/ μ l 1 μ l, RNasin 1 μ l (20 u), MMLV 逆转录酶 1 μ l (100 ~ 200 u), 补足 DEPC H₂O 至 20 μ l。37 $^{\circ}$ C 下温育 1 h, 95 $^{\circ}$ C 加热 5 min 终止反应, 放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.3.3 PCR 反应: 取各组 cDNA 2 ~ 10 μ g, 分别加入如下反应体系: 10 $\times$ buffer (Taq 酶的) 5 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ l, dNTPs (10 mmol/L) 1 μ l, 上游引物 (10 pmol/ μ l), 下游引物 (10 pmol/ μ l) 各 1 μ l, 内参上下游引物各 1 μ l, Taq 酶 (2 ~ 2.5 u) 1 μ l, 补足 H₂O 至 50 μ l 体积, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 于 95 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 进行 35 个循环, 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.4 电泳: 1.5% 琼脂糖凝胶, 85 V 电压条件下行各组 PCR 产物电泳, 美国 UVP 凝胶成像分析系统照相并进行各电泳条带吸光度值分析。

1.4 统计学处理

将各组目的条带与内参条带光密度比值均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。所有试验数据均通过 SPSS 11.5 软件统计分析。经过单因素方差分析, 行双侧 t-test, P 值取 0.05。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠成骨细胞的鉴定

2.1.1 形态学: 倒置显微镜下观察可见原代培养的细胞贴壁生长, 呈现三角形、星形、短梭形或纺锤形等多种形态, 形态相似的细胞成堆出现。细胞胞浆向外伸展出 2 ~ 4 个突起, 有的突起已相互联结 (图 1)。

2.1.2 碱性磷酸酶染色: 培养的成骨细胞染色后显微镜下可见胞浆内散在的棕黑色或黑色颗粒, 呈典型的 ALP 染色阳性反应 (图 2)。

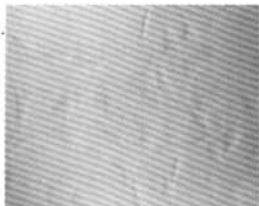


图 1 原代大鼠颅盖骨成骨细胞
(72 h,100 ×)
Fig.1 primary rat osteoblasts
(72 h,100 ×)

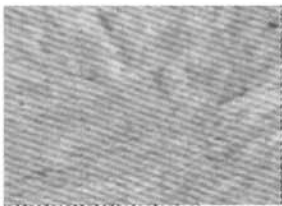


图 2 成骨细胞碱性磷酸酶染色(100 ×)
Fig.2 The cells layer displayed strong positive
staining for alkaline phosphatase (ALP)
after 3 days of culture(100 ×)

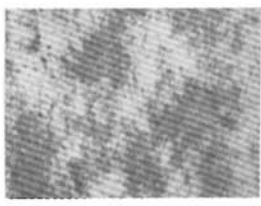


图 3 茜素红-S 染色可见明显的
红染钙盐沉积(100 ×)
Fig.3 Alizarin Red staining of calcium phosphate
deposits in rat osteoblasts(100 ×)

2.1.3 体外成骨实验：培养的成骨细胞经茜素红-S 染色可见明显的红染钙盐沉积(图 3),确定所分离培养的细胞具有体外成骨的能力。

经上述各指标的鉴定 ,确定本课题的原代新生鼠颅骨成骨细胞分离培养的实验技术可靠 ,能保证研究所用成骨细胞的来源。

2.2 依普拉芬对各组细胞 BMP-2 和 TGF-β₁ mRNA 表达的影响

电泳检测显示 :大鼠成骨细胞在不同浓度的依普拉芬条件下培养 72 h 后 ,各组细胞中的 BMP-2 TGF-β₁ 及内参照 mRNA 均有不同程度的表达(图 4、5)。

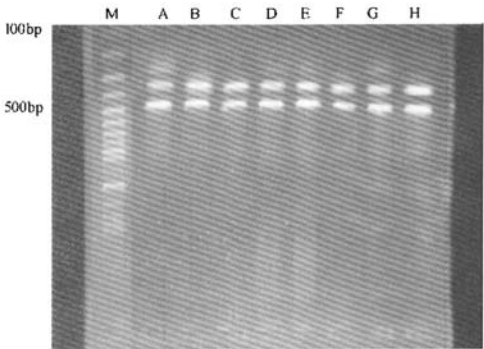


图 4 各组细胞 BMP-2 及内参 mRNA 表达的电泳条带
Fig.4 Electrophoresis strap of BMP-2 and
β-actin mRNA in all groups. (Marker:DNA ladder)

统计学分析表明 :与阴性对照组比较 ,各浓度组均能使成骨细胞 BMP-2、TGF-β 和内参照 mRNA 表达吸光度比值增高 ($P < 0.01$),但是均比阳性对照组作用弱 ($P < 0.01$)。其中 10^{-8} mol/L ~ 10^{-5} mol/L 之间增加最明显 ,见表 1。

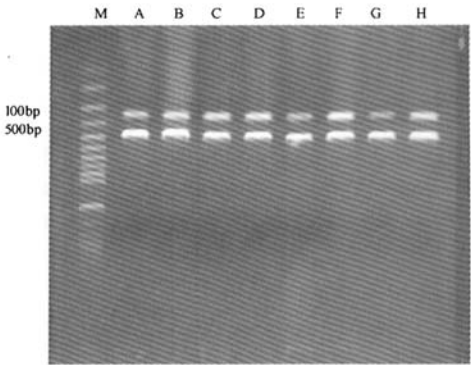


图 5 各组细胞 TGF-β₁ 及内参 mRNA 表达的电泳条带
Fig.5 Electrophoresis strap of TGF-β₁ and β-actin
mRNA in all groups. (Marker:DNA ladder)

表 1 各组细胞 BMP-2 及 TGF-β₁ 电泳条带和
内参条带吸光度比值(% $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

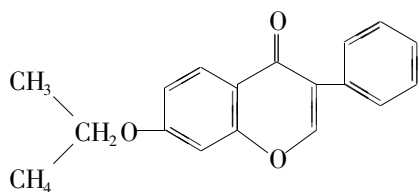
Table 1 Intensities of the BMP-2 and TGF-β ₁ specific bands Percentage of the intensity of β-actin specific fluorescence (% $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)		
组别	BMP-2	TGF-β ₁
A(阴性对照)	11.35 ± 0.17	21.41 ± 0.19
B(阳性对照)	63.33 ± 0.18	126.40 ± 0.21
C(依普拉芬 10^{-10} mol/L)	16.31 ± 0.18*#	37.65 ± 0.25*#
D(依普拉芬 10^{-9} mol/L)	18.44 ± 0.14*#	40.54 ± 0.24*#
E(依普拉芬 10^{-8} mol/L)	48.35 ± 0.21*#	48.47 ± 0.25*#
F(依普拉芬 10^{-7} mol/L)	57.46 ± 0.21*#	113.51 ± 0.16*#
G(依普拉芬 10^{-6} mol/L)	32.45 ± 0.26*#	70.66 ± 0.28*#
H(依普拉芬 10^{-5} mol/L)	36.46 ± 0.22*#	75.40 ± 0.20*#

注 :与阴性对照组比较 * $P < 0.01$;与阳性对照组比较 # $P < 0.01$
Note : comparison to group A ,* $P < 0.01$;comparison to group B ,
$P < 0.01$

3 讨论

中老年妇女绝经后血清雌激素浓度下降 ,雌激素缺乏导致骨丢失 ,因而雌激素在维持骨量过程中

起着十分重要的作用。雌激素替代疗法(Estrogen Replacement Therapy ERT or hormone replacement therapy HRT)被认为是绝经后骨质疏松症(PMOP)防治的首选治疗方案。雌激素虽可有效治疗预防 PMOP ,但是雌激素替代治疗骨质疏松,易造成子宫内膜癌、乳腺癌、阴道出血及其他危害,这就促使人们希望寻找一种具有雌激素样的对骨骼系统具既有益而无副作用的药物。依普拉芬(7 异丙氧基黄酮)是由类黄酮中的异黄酮合成而来的,分子式为 $C_{18}H_{16}O_3$, 分子量 280.32, 其分子结构为:



属植物雌激素类药物,与植物雌激素和 17- β 雌二醇具有部分相似结构,据报道对哺乳动物和人类有雌激素/抗雌激素的作用。异黄酮具有选择性雌激素受体调节剂的作用,异黄酮与子宫 A 受体结合,发挥拮抗作用,避免了雌激素替代治疗中的并发症。

动物实验和细胞培养研究表明,大豆异黄酮对成骨细胞增殖、大鼠骨代谢有促进作用^[2],但其具体机理目前仍未完全明确,一些细胞因子在调节成骨细胞增殖和分化以及骨代谢过程中起着重要作用。转化生长因子 β (TGF- β) 是成骨细胞中含量较多的生长因子,可由成骨细胞产生并以自分泌的形式,对成骨细胞的复制和基质的合成起双向调节作用,其中 TGF- β_1 是骨骼中重要的传导物质之一^[3]。同时,成骨细胞的细胞膜上有 TGF- β 的特异性受体, TGF- β 可作用于成骨细胞,调节其增殖和分化。临床对老年性骨质疏松的研究表明, TGF- β_1 与骨密度呈显著正相关。全身性激素的作用会直接或间接影响生长因子 TGF- β_1 的产生,从而减少骨吸收和增加骨形成^[4]。骨形态发生蛋白(BMP)是 TGF β 超家族成员,是具有高度骨诱导活性的低分子量多肽。近年来,实验证明 BMP 是骨形成的重要调节因子。在骨形成过程中, BMP 具有诱导间充质细胞迁徙、增殖、分化,最终导致软骨、骨形成的作用,可以认为 BMP 参与了骨形成的各个阶段^[5], BMP-2 已被公认为是成骨细胞的转化促进因子^[6,7],成骨细胞在体内各种调控因素的调节下发展而来, BMP-2 是主要调控因素之一。成骨细胞内 BMP-2 表达增高,细胞自分泌 BMP-2 增多,成骨细胞以自分泌的方式调节其自身的增

殖、分化及代谢^[8]。

关于植物雌激素类药物对骨生长因子的影响,李万里等^[9]的研究结果表明:在成骨细胞形成中,大豆异黄酮对 TGF- β_1 及其 TGF- β R 1、TGF- β R 2 受体信号传导系统有显著促进作用。Viereck 等^[10]用半定量 RT-PCR 和 Northern Blot 方法分析了另种植物雌激素-金雀异黄素,对人类小梁骨成骨细胞骨保护素(OPG)生成的影响,结果发现不同剂量和作用时间的金雀异黄素可以使 OPG mRNA 和蛋白分泌增加 2~6 倍。从而认为植物雌激素可以上调 OPG 基因转录,促进骨保护素的生成,从而预防骨丢失。Jia 等^[11]研究显示:大豆黄酮可以使大鼠成骨细胞 BMP-2 mRNA 增加 5 倍,蛋白增加 7 倍,从而显著提高 BMP-2 合成;同时发现大豆黄酮可以刺激不同阶段的成骨细胞分化,对体外培养的成骨细胞骨形成有直接作用。因此认为这种作用可能通过增加成骨细胞 BMPs 生成来介导的。

本研究中发现适宜浓度的依普拉芬可以促进成骨细胞 TGF- β_1 和 BMP-2 mRNA 表达,在细胞水平证实依普拉芬对成骨细胞作用有类雌激素的作用,可能通过促进成骨细胞这两种细胞因子的分泌,从而促进成骨细胞的增殖和分化,增强其对钙磷的吸收,提高绝经后妇女的骨密度,预防骨质疏松。

关于植物雌激素能否作为雌激素的替代物用于绝经后妇女激素替代疗法,目前的数据还不足以下一个确定性的结论。尽管流行病学和基础性实验研究提示异黄酮对特定的靶组织可能具有保护作用,但是还需要进行进一步的随机和安慰剂对照的临床研究来确定这些重要作用。

【参 考 文 献】

- [1] Arjmandi BH, Birnbaum RS, Juma S, et al. The synthetic phytoestrogen, ipriflavone, and estrogen prevent bone loss by different mechanisms. *Calcif Tissue Int*, 2000, 66(1): 61-65.
- [2] Choi EM, Suh KS, Kim YS, et al. Soybean ethanol extract increase the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phyto Chemistry*, 2001, 56(7): 733-739.
- [3] 于明香,王洪复. 骨生长因子的生物学作用与增龄改变. *中国骨质疏松杂志*, 2001, 7(2): 179-181.
- [3] YU MX, WANG HF. The biological effect and aging change of bone growth factor. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2001, 7(2): 179-181 (in Chinese).
- [4] 梁晓萍,肖学吕,徐宜英,等. 生长因子与老年性骨质疏松相关性的临床研究. *中国骨质疏松杂志*, 2001, 7(2): 128-130.

(下转第 73 页)

- [4] Liang XP , Xiao XL , Xu YY , et al. Relationship between elderly osteoporosis and transforming growth factor-beta-1 , insulin-like growth factor-1 and epidermal growth factor. Chinese Journal of Osteoporosis 2001 , 7(2) :128-130(in Chinese).
- [5] Onishi T , Ishidou Y , Nagamine T , et al. Distinct and overlapping patterns of localization of bonemorphogenetic proteinfamily members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. Bone , 1998 , 22 :605-612.
- [6] Geesink RG , Hoefnagels NH , Bulstra SK. Osteogenic activityof OP-1 bone morphogenetic protein(BMP-7)in a human fibular defect. J Bone Joint Surg(Br) , 1999 , 81(4) :710-718.
- [7] Cummings SR , Bauer D. Do statins prevent both cardiovascular disease and fracture. JAMA 2000 , 283(24) :3255-3257.
- [8] 卢卫忠 ,唐康来 ,杨柳 ,等. TGF- β 对成骨细胞的作用. 第三军医大学学报 2000 , 22(1) :94-96.

- [8] Lu WZ , Tang KL , Yang L , et al. Effects of transforming growth factor β on osteoblasts. Acta Academiae Medicine Militaris Tertiae , 2000 , 22(1) :94-96(in Chinese).
- [9] 李万里 ,田玉慧 ,杨献军 ,等. 大豆异黄酮对成骨细胞转化生长因子- β_1 及其受体 I、II 的影响. 中医药学刊 , 2004 , 22(1) :47-48.
- [9] Li WL , Tian YH , Yang XJ , et al. Effects of isoflavone on transforming growth factor β_1 and it's receptor I、II in osteoblasts. Study Journal of Traditional Chinese Medicine 2004 , 22(1) :47-48(in Chinese).
- [10] Viereck V , Grundker C , Blaschke S , et al. Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts. J Cell Biochem , 2002 , 84(4) :725-735.
- [11] Jia TL , Wang HZ , Xie LP , et al. Daidzein enhances osteoblast growth that may be mediated by increased bone morphogenetic protein (BMP) production. Biochem Pharmacol , 2003 , 65(5) :709-715.