

11 β 羟化类固醇脱氢酶 1 与成骨细胞分化之间相互关系的研究

孙岩 程鹏 张爱森 俞静 谢宇 朱亭 刘娟 刘云 丁国宪

摘要:目的 通过体外地塞米松刺激原代大鼠成骨细胞分化,观察 11 β 羟化类固醇脱氢酶 1(11 β -HSD1)在成骨细胞分化中的变化以及相关成骨基因的表达情况,探讨 11 β -HSD1 与成骨细胞分化之间关系以及可能的作用机制。方法 采用酶消化法获得大鼠成骨细胞,建立地塞米松(Dex)药物刺激模型(Dex组 1×10^{-8} mol/L 和正常对照组),分别于培养 0、2、4、6、8、10 d 抽提 RNA 行 RT-PCR 和蛋白行 Western Blot 检测成骨细胞相关基因和 11 β -HSD1 的表达情况。结果 11 β -HSD1 在正常成骨细胞中随着培养表达逐渐升高,在 Dex 刺激组中成骨细胞分化指标 ALP、COL I 较对照组明显升高,伴有 11 β -HSD1 mRNA 和蛋白水平的下调。结论 在成骨分化过程中,11 β -HSD1 表达下降,与分化呈逆相关。11 β -HSD1 可能通过自分泌的方式参与调节成骨细胞的分化。

关键词: 11 β 羟化类固醇脱氢酶 1; 成骨细胞; 地塞米松; 细胞分化

The research of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in the mechanism of osteoblastic differentiation SUN Yan, CHENG Peng, ZHANG Aisen, et al. Department of Geratology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and osteoblastic differentiation. **Methods** The primary osteoblasts were obtained by sequential enzymatic digestion of fetal rat calvaria and the models of drug-stimulated by Dex (1×10^{-8} mol/L) and the control was built. We detected the expression of the osteoblast related genes and 11 β -HSD1 mRNA and protein by RT-PCR and Western blot. **Results**

11 β -HSD1 was up-regulated in the course of primary culture. In the Dex-stimulated models, ALP and COL I were obviously up-regulated compared to the unstimulated group. The mRNA and protein levels of 11 β -HSD1 were down-regulated in the Dex-stimulated models. **Conclusions** The expression of 11 β -HSD1 is closely related to osteoblastic differentiation. During the differentiation process, the expression of 11 β -HSD1 decreased. In osteoblasts, there may be a negative relation between 11 β -HSD1 expression and cell differentiation.

Key words: 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1; Osteoblast; Dexamethasone; Cell differentiation

糖皮质激素对骨代谢的作用并不一致。在人和大鼠骨髓基质细胞诱导成骨分化及形成细胞外基质的过程中,糖皮质激素起着重要作用^[1]。而药理剂量的糖皮质激素则可以引起骨质疏松症,主要是抑制了骨形成,同时对骨吸收也有作用^[2]。总体来说,糖皮质激素对于骨的作用较为复杂,主要依赖于糖皮质激素作用的时间和浓度,以及成骨细胞与破骨细胞的分化阶段^[3,4]。

在分子水平上,糖皮质激素信号是通过糖皮质激素受体(GR α)介导的。GR α 几乎表达于所有细胞

中,在成骨细胞中,它主要通过糖皮质激素反应元件结合,调节靶基因的表达,包括有骨钙素、I型胶原、TGF β -1等。对于糖皮质激素应答的调节,可以发生在多个水平,包括 GR α 水平与受体后水平。同时糖皮质激素作用还可以通过 11 β 羟化类固醇脱氢酶(11 β -HSD)的作用,进行受体前调节。11 β -HSD是局部组织调节糖皮质激素水平的关键酶,它分为 1型和 2型,可以催化氢化可的松和可的松相互转化。11 β -HSD1具有双向作用(脱氢酶/还原酶),在成骨细胞中,通过表达还原酶活性,可以催化无活性的可的松成为有活性的氢化可的松,因而也可称为是糖皮质激素作用的“放大器”^[5]。成骨细胞中调节 11 β -HSD1活性可能是成骨细胞增殖、分化和功能的一个

重要的决定因素^[6,7]。目前对于 11 β -HSD1 在正常成骨细胞发育中所起作用尚不清楚。本实验通过体外特定浓度地塞米松刺激原代大鼠成骨细胞分化,观察分化与 11 β -HSD1 之间的相互关系,进一步探讨 11 β -HSD1 在成骨细胞分化中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

新生 SD 大鼠(出生后 36 h 内)由江苏省实验动物中心提供。DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司,EDTA、II 型胶原酶、地塞米松购自 Sigma 公司,牛血清白蛋白购自 GIBCO 公司,焦碳酸二乙酯(DEPC)、Trizol 购自 Invitrogen 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,ALP 染色试剂盒购自南京建成公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 成骨细胞培养 采用酶消化法原代培养大鼠成骨细胞,步骤简述如下:拉颈处死大鼠,于 75% 酒精中浸泡 3 min 后取出头盖骨,在 Hanks 液中去附着软组织和骨膜后剪碎,II 型胶原酶(Hanks 液) 37 $^{\circ}$ C 振荡水浴分别消化 20 min 和 90 min,弃去第 1 次消化液,收集第 2 次消化液并离心(900 rpm/min, 5 min),经 Hanks 液洗涤 2 次后,滤网滤除杂质后离心,将细胞团悬浮于 10% FBS 的 DMEM 中,置入 25 ml 培养瓶中,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h 后换

培养基,以后隔天换液,待细胞达 80% ~ 90% 融合时,以 0.25% 胰蛋白酶消化传代。实验用第 2 代培养细胞。

1.2.2 成骨细胞鉴定 采用偶氮偶联法 ALP 染色进行成骨细胞鉴定,使用 ALP 染色试剂盒,步骤详见说明书,阳性结果为胞浆中可见红色 ALP 阳性颗粒。

1.2.3 DEX 药物刺激模型建立 取生长良好的成骨细胞,以胰酶消化,计数,按 5.0×10^4 /ml 接种于 60 mm 培养皿中,培养 24 h 后,换新鲜培养液,加入 1×10^{-8} mol/L Dex 培养 24 h,以此点为 0 d,分别于培养 0、2、4、6、8、10 d 抽提细胞($n = 3$)总 RNA 和蛋白质行 RT-PCR 及 Western blot 检测,每一时间点用正常细胞作为对照。实验重复 3 次。

1.2.4 RT-PCR 收集 Dex 药物刺激组($n = 3$)及正常对照组细胞($n = 3$),采用 Trizol 一步法分别提取两组细胞总 RNA,分光光度计测定浓度,OD 260/280 比值在 1.8 ~ 2.0 之间。取 2 μ g 总 RNA 进行逆转录成 cDNA,引物按 GenBank 相关序列由 Primer 5.0 软件设计,所用引物见表 1。取 2 μ l cDNA 作为模板于 20 μ l 反应体系中行 PCR。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,33 个循环,72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 2 min。最后取 5 μ l 扩增产物,1.2% 琼脂糖凝胶电泳。利用凝胶成像系统进行光密度扫描,求取每一样品和 β -actin 的光密度比值。

表 1 PCR 引物序列

目的基因	上游引物	下游引物	产物大小 (bp)
11 β -HSD1	5'-TCAGACCAGAAATGCTCCAG-3'	5'-AGGAGATGATGGCAATGCTG-3'	471
GR	5'-ACCTGCTCTGCTTTGCTC-3'	5'-GGAGTTCCTTCCCTTTT-3'	278
ALP	5'-TCGGACCCTGCCTTACCA-3'	5'-TGTCTCCTCGCCCGTGT-3'	227
COL I	5'-CAAGACAGTCATCGAATACA-3'	5'-AGTCCATGTGAAATGTGCTC-3'	252
OPG	5'-TCTTGGCACCTACCTAAACAGCA-3'	5'-CTACACTCTCTGCAITCACTTTGG-3'	578
RANKL	5'-GTGTCTCGACATCGCTCTG-3'	5'-CGCTGGCCACATCCAACC-3'	280
β -actin	5'-CACGATGGAGGGCCGACTCATC-3'	5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3'	250

1.2.5 Western blot 收集 Dex 药物刺激组($n = 3$)及正常对照组细胞($n = 3$),提取细胞总蛋白质,用考马斯亮兰法测定蛋白质浓度,制备 10% SDS-PAGE 分离胶及 5% 浓缩胶,60 V 稳压电泳,湿转至 PVDF 膜,按 Western blot 检测试剂盒说明进行操作。其中一抗为兔抗小鼠多克隆抗体(11 β -HSD1, 1:2000)购自美国 Research Genetics 公司,二抗为羊抗兔(IgG-HRP, 1:20 000)。用 ECL 检测方法检测。实验所得 Western Blot 条带,由 Photoshop 软件处理后,在 BandsScan 分析软件中测得各自的总灰度值,进行定

量比较分析,并且均采用自身 β -actin 灰度值校正。

1.2.6 统计学处理 实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,SPSS 11.00 统计软件进行 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 成骨细胞鉴定

经偶氮偶联法 ALP 染色,光镜下可见到 90% 以上细胞染色阳性,胞质中可见红色颗粒,提示分离培养的细胞为成骨细胞(图 1)。

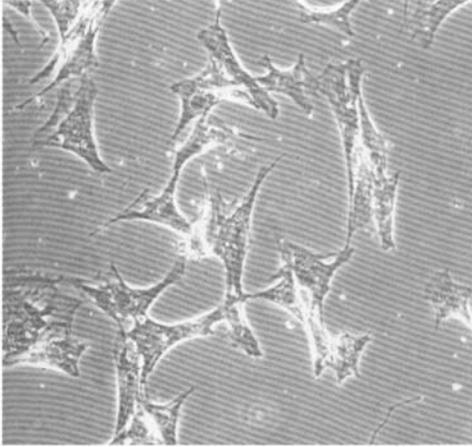


图1 大鼠成骨细胞(碱性磷酸酶×200)

2.2 正常培养及 Dex 刺激分化过程中 11β-HSD1 和 GR 表达。

11β-HSD1 的表达无论是在 mRNA 水平还在蛋白水平上 ,Dex 组较对照组均有明显下降(图 2),在正常对照组中 ,随着培养的进行 ,11β-HSD1 表达逐渐增加 ,而当加入地塞米松诱导分化后 ,可以发现似乎随着分化 ,11β-HSD1 的表达相对下降 ,与分化呈负相关(图 3)。而 GR 的表达在 Dex 组和对照组中 ,各时间点的表达水平基本一致 ,但是 Dex 组较对照组有明显增加(图 4)。

2.3 DEX 对成骨细胞分化的影响

分别于培养 0、2、4、6、8、10 d 抽提细胞总 RNA 行 RT-PCR 检测成骨细胞分化标志基因 ALP、COL I。结果显示 Dex 组与正常对照组相比 ,

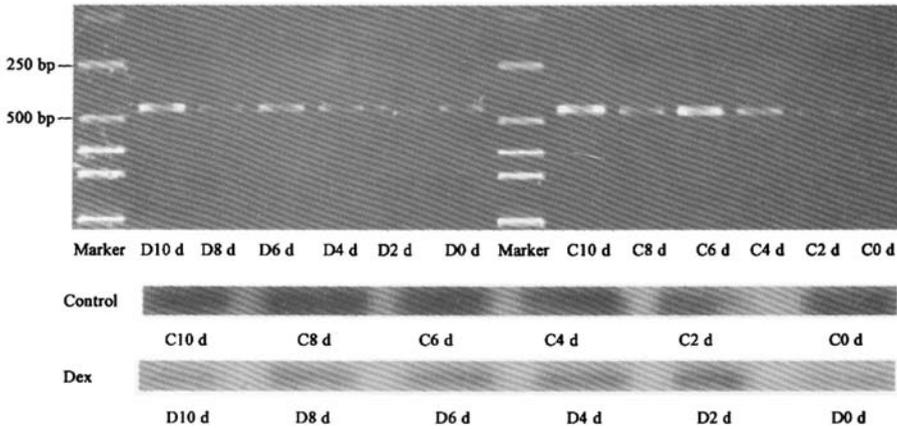


图2 11β-HSD1 在 mRNA 和蛋白水平的表达情况。与对照组比较,Dex 组在各点上表达上显著降低

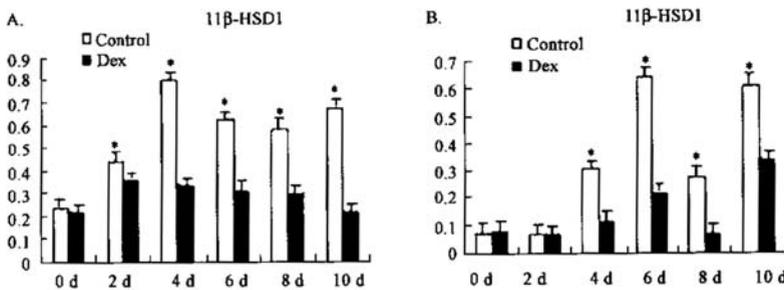


图3 11β-HSD1 在 mRNA 和蛋白水平上表达情况。A:在蛋白水平上,Dex 组的表达较对照组显著下降 ($P < 0.05$)。对照组中 11β-HSD1 随培养逐渐增加,而在 Dex 组则始终处于相对较低水平,与分化呈负相关。B:在 mRNA 水平上,Dex 组的表达较对照组也明显下降 ($P < 0.05$)

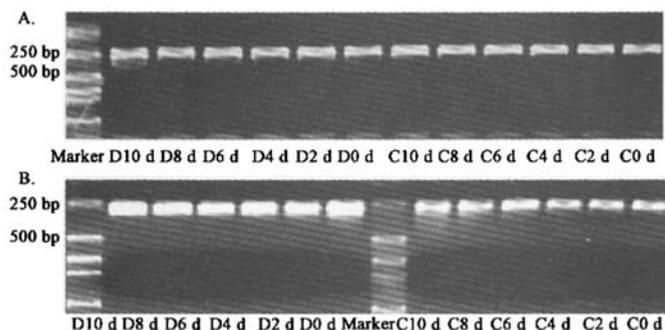
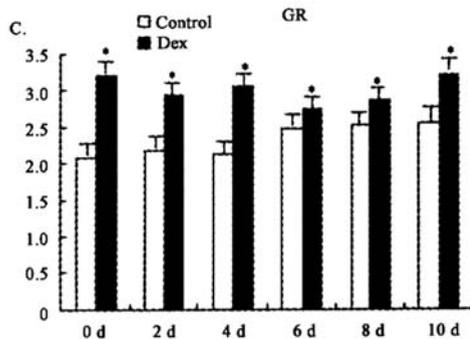


图4 GR的表达情况。A:内参β-actin在Dex组(D0d-D10d)和对照组(C0d-C10d)中各时间点的表达。B:GR在各点的表达。
C:GR在两组中各时间点表达基本一致,但Dex组较对照组同一时间点上的表达明显增加($P < 0.05$)



ALP、COL I 在各时间点的表达水平明显增加,可见 1×10^{-8} mol/L 地塞米松能够显著促进体外成骨细胞

分化(图5 B C)。在各个时间点上,两组指标差异有显著性($P < 0.05$) (图6)。

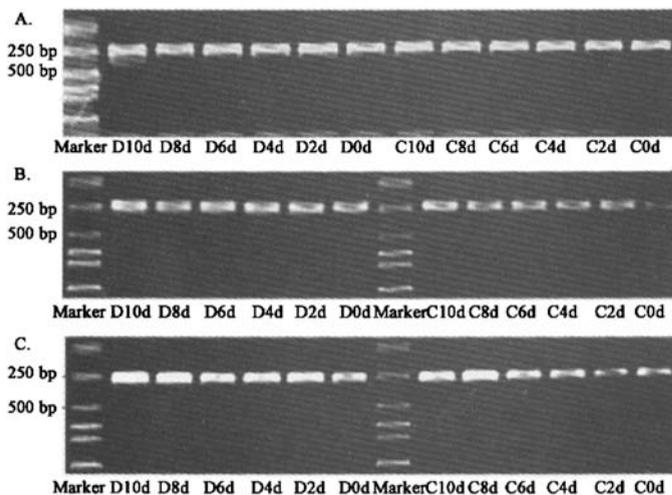


图5 ALP和COL I 表达情况。A:内参β-actin在Dex组(D0d-D10d)和对照组(C0d-C10d)中各时间点的表达。B:ALP在两组中各点的表达。C:COL I 在两组中各点的表达

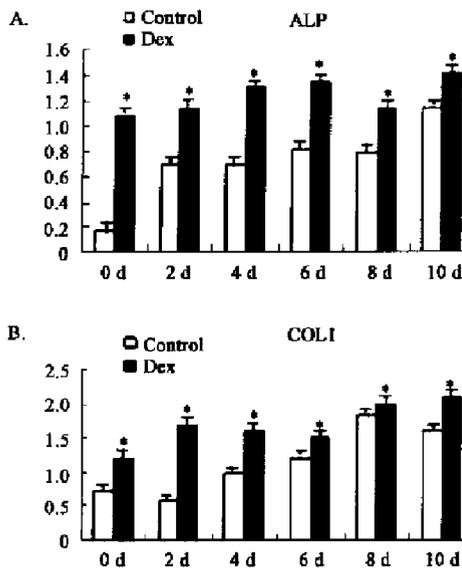


图6 各项指标在Dex组和对照组之间表达情况。A:ALP在Dex组各时间点表达较对照组显著增加($P < 0.05$);B:COL I 在Dex组各时间点表达较对照组增加显著($P < 0.05$)

2.4 DEX 对成骨细胞功能的影响

成骨细胞可以分泌 OPG、RANKL 等,调节成骨细胞及破骨细胞功能。两者表达情况如图(图7 B C)。当低浓度地塞米松(1×10^{-8} mol/L)加入成骨细胞培养中,OPG 的表达较对照组增加,而且在 0、6、8、10 d 时差异有显著性($P < 0.05$) (图8 A)。RANKL 的表达在两组之间没有明显差异(图8 B)。

3 讨论

糖皮质激素在临床上广泛使用,用于治疗炎症

等多种疾病,但是其长期使用又会带来明显的副作用,包括骨质疏松症,严重者将导致骨折,目前已日益引起世人关注。糖皮质激素对骨代谢的作用机制较复杂,体内体外实验结果亦不一致。目前在体内实验中发现糖皮质激素主要通过诱导成骨细胞凋亡,抑制骨形成,导致骨质疏松症的发生^[8]。另外也有研究指出糖皮质激素可以通过直接作用于破骨细胞,加强骨吸收^[9]。但是在体外实验则发现糖皮质激素对原代培养的大鼠成骨细胞系有显著的促进骨形成作用^[10],这种促进作用与糖皮质激素浓度有

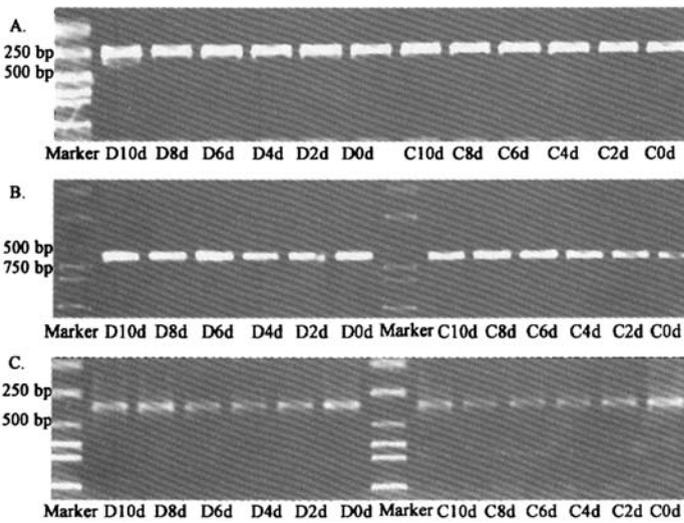


图7 OPG和RANKL的表达情况。A:内参β-actin在Dex组(D0d-D10d)和对照组(C0d-C10d)中各时间点的表达。B:OPG在两组中各点的表达。C:RANKL在两组中各点的表达

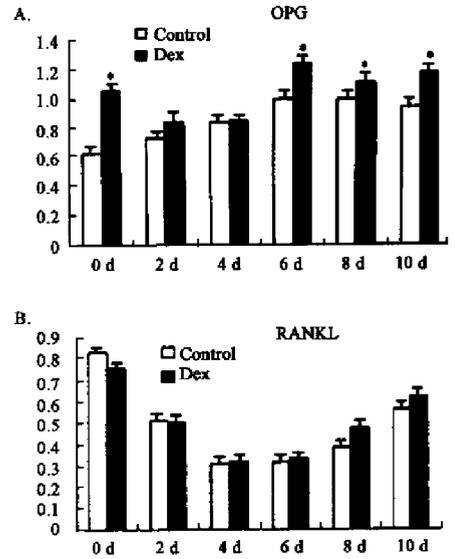


图8 OPG和RANKL在Dex组和对照组之间表达情况。A:OPG分别在0、6、8、10 d时,Dex组表达较对照组显著增加($P < 0.05$);B:RANKL表达在两组差异无显著性

关, 1×10^{-7} mol/L, 1×10^{-8} mol/L 均可以促进成骨分化,但相对生理水平,较高浓度的 1×10^{-7} mol/L 可能具有抑制增殖作用,而相对低浓度的 1×10^{-8} mol/L 则无此作用^[11]。在本实验中,拟利用特定浓度的地塞米松(1×10^{-8} mol/L)诱导成骨细胞分化,观察 11β -HSD1 对成骨细胞分化的影响并探讨其作用机制。

11β 羟化类固醇脱氢酶(11β -HSD)是调节糖皮质激素的关键酶,它有两种亚型(11β -HSD1 和 11β -HSD 2),催化有活性的氢化可的松和无活性的可的松之间互相转换。 11β -HSD1 具有双向调节作用,既可将氢化可的松转化为可的松而灭活,也可将无活性的可的松转化为有活性的氢化可的松, 11β -HSD1 主要分布于肝脏、脂肪、性腺、脑、骨等组织,在这些组织中以还原作用为主,调节组织糖皮质激素到达其受体的量及循环中糖皮质激素浓度。 11β -HSD 2 为单向选择性的,仅催化脱氢反应,使氢化可的松转化为可的松。目前这两种酶在骨中均已得到证实。通过在局部调节糖皮质激素的水平, 11β -HSD1 可能会对骨代谢起着重要作用。在体内成骨细胞中, 11β -HSD1 可以通过表达还原酶活性,增加局部糖皮质激素水平,从而影响成骨细胞的增殖和分化;相反,通过表达脱氢酶活性则可以降低局部的糖皮质激素水平^[12]。

我们的研究结果显示低浓度的地塞米松(1×10^{-8} mol/L)能够促进体外培养的成骨细胞的分化,分化标志基因 ALP, COL I 在 Dex 组较对照组均有显著增加。(图 6)地塞米松在成骨细胞培养中明显促进骨形成的作用机制还不十分清楚。成骨细胞分泌的 OPG 和 RANKL 是耦联骨形成和骨吸收的重要因子, Dex 刺激分化后,可以发现 OPG 较对照组分别在 0、6、8、10 d 时候有显著增加,而 RANKL 的表达在两组之间差异无显著性。(图 8)在体内,地塞米松可能通过调节 RANKL/OPG 来影响破骨细胞的形成。在正常对照组中,随着培养的进行, 11β -HSD1 表达逐渐增加,而当加入地塞米松诱导分化后, 11β -HSD1 的表达无论在 mRNA 水平还是在蛋白水平, Dex 组均较对照组有明显下降,与分化呈负相关。(图 3) GR 的表达在对照组和 Dex 组中各时间点表达基本一致,而在同一时间点, Dex 组则较对照组明显增加。本研究假设,在原代大鼠成骨细胞分化过程中可能存在着一种内在的分化驱使的分子机制,控制着 11β -HSD1 的表达和活性以及氢化可的松的生成。当细胞正常生长时, 11β -HSD1 的表达和活性随着培养时间而增强,与此相反的是,当给予外源糖皮质激素诱导其分化时, 11β -HSD1 的表达和活性却相对降低。换言之, 11β -HSD1 以自分泌方式活化氢化可的松,促进合适的分化。而当足够的活性糖皮质激素

(如氢化可的松、地塞米松等)诱导成骨细胞分化时,由11 β -HSD1介导内源性糖皮质激素的活化则保持在较低水平。通过这两者之间的相互调节机制,成骨细胞分化与局部糖皮质激素水平处于动态平衡中。

以往研究在脂肪细胞中可以观察到对糖皮质激素作用的自分泌调节机制,并且这可能成为潜在的治疗肥胖的重要靶点^[13]。新鲜分离的脂肪间质细胞中,11 β -HSD1主要是将氢化可的松钝化为可的松。而当诱导脂肪分化时,11 β -HSD1的脱氢酶活性即转为还原酶,活化可的松,促进脂肪分化。在本研究中,成骨细胞可能亦可利用11 β -HSD1活性通过自分泌的方式调节它们的分化。不同的是,在成骨细胞中,11 β -HSD1活性与分化过程呈负相关,而在脂肪细胞中,则是呈正相关。

综上所述,本研究通过体外细胞培养显示11 β -HSD1随着成骨细胞分化而表达下降,与分化呈逆相关。其中可能的机制是,在分化过程中,通过控制11 β -HSD1的表达,从而调节糖皮质激素的水平,以促进合适的成骨细胞分化。但其在体内的作用机制尚需进一步研究。本研究为11 β -HSD1对成骨细胞分化及功能影响的分子机制的探讨奠定了一定的基础。

【参 考 文 献】

[1] Cheng SL, Zhang SF, Avioli LV. Expression of bone matrix proteins during dexamethasone-induced mineralization of human bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem*, 1996, 61 :182-193.

[2] Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids: Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest*, 1998, 102 :274-282.

[3] Hirayama T, Sabokbar A, Athanasou NA. Effect of corticosteroids on human osteoclast formation and activity. *J Endocrinol*, 2002, 175 :155-163.

[4] Pockwinse SM, Stein JL, Lian JB, et al. Developmental stage-specific cellular responses to vitamin D and glucocorticoids during differentiation of the osteoblast phenotype: interrelationship of morphology and gene expression by in situ hybridization. *Exp Cell Res*, 1995, 216 :244-260.

[5] Canalis E, Delany AM. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, an amplifier of glucocorticoid action in osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(6) :979-986.

[6] Cooper MS, Hewison M, Stewart PM. Glucocorticoid activity, inactivity and the osteoblast. *J Endocrinol*, 1999, 163 :159-164.

[7] Canalis E, Delany AM. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase, an amplifier of glucocorticoid action in osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 2002, 17 :987-990.

[8] Cooper MS. Sensitivity of bone to glucocorticoids. *Clin Sci (Lond)*, 2004, 107(2) :111-123.

[9] Kim HJ, Zhao H, Kitaura H, et al. Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast. *J Clin Invest*, 2006, 116(8) :2152-2160.

[10] Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, et al. Mineralized bone nodules formed *in vitro* from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int*, 1986, 38(3) :143-154.

[11] Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C, et al. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors *in vitro*: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)*, 2001, 40(1) :74-83.

[12] Cooper MS, Walker EA, Bland R, et al. Expression and functional consequences of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human bone. *Bone*, 2000, 27(3) :375-381.

[13] Wake DJ, Walker BR. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obesity and the metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 215 :45-54.