

骨保护素和骨保护素配体在人骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程中的表达

杨林 海涌 曲铁兵 陶天遵 刘忠厚 周君琳 杜心如

摘要: **目的** 研究骨保护素和骨保护素配体在人骨髓基质细胞向成骨细胞诱导分化过程中的表达情况,探讨其在骨重建过程中的调节作用。**方法** 实验中采用梯度离心法和酶消化法分别获得人骨髓基质细胞和成骨细胞,并将骨髓基质细胞向成骨细胞方向诱导分化。通过形态学观察、生化指标检测、细胞染色和矿化结节测定等方法,确定骨髓基质细胞的功能状态和分化程度。采用 RT-PCR 和 Western blot 方法,检测骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程中骨保护素和骨保护素配体的表达情况。**结果** 获得的骨髓基质细胞和成骨细胞生长状态良好,生化指标稳定。骨髓基质细胞分化后,碱性磷酸酶分泌明显增加,可以产生大量的矿化结节,具有成熟成骨细胞的表型特征。RT-PCR 和 Western blot 检测,在骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程中,骨保护素在 mRNA 和蛋白质水平的表达明显升高,而骨保护素配体的表达则逐渐下降。细胞中 OPGmRNA 表达在第 21 天时达到最大,约为未分化时水平的 2.5 倍。而 OPGLmRNA 表达减少为未分化时 1/2;细胞中 OPG 的蛋白质表达水平提高约为未分化细胞的 6 倍。统计学分析, $P < 0.01$, 差异有显著性。**结论** 在人骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程中,骨保护素表达逐渐升高而骨保护素配体表达显著降低,两者比值的逐渐增大,从而发挥促进骨形成,抑制骨吸收的作用,这可能是协调骨重建周期有序进行的重要机制之一。

关键词: 骨保护素; 骨保护素配体; 人; 骨髓基质细胞; 成骨细胞

Expression of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand during human marrow stromal cells differentiating into osteoblasts YANG Lin, HAI Yong, QU Tiebing, et al. Beijing Chaoyang Hospital, Affiliated to Capital Medical University, Orthopaedics Department, Beijing 100020, China

Abstract: **Objective** To observe the expression of osteoprotegerin (OPG) and osteoprotegerin ligand (OPGL) during human marrow stromal cells (hMSC) differentiating into human osteoblasts (hOB); To analyze the mechanism of regulation of bone remodeling. **Methods** The hMSC were obtained from bone marrow specimens by the method of gradient centrifugation, and hOB were obtained by the method of enzyme digestion. Then the cells were incubated with differentiation medium and differentiated along the hOB pathway. Morphology observation, biochemical detection and cells staining were performed during hMSC differentiation. Then OPG and OPGL mRNA level were analyzed by RT-PCR, and OPG protein secretion was detected by Western blot. **Results** Of the hMSC and hOB, the survival condition was good, the biochemical indexes were stable, the degree of purification was excellent. The following data demonstrated that ALP secretion of differentiated hMSC increased significantly compared with undifferentiated cells. And the matrix secreted by differentiated hMSC began to mineralize significantly. OPG mRNA levels and protein secretion increased significantly, but OPGL secretion decreased during stromal-osteoblast differentiation. The data demonstrated that volume of OPGmRNA secreted was 2.5 times higher than the control undifferentiated group, while volume of OPGLmRNA reduced to one half of control undifferentiated group at the 21st day. At the same time, the volume of OPG protein secretion increased 6 times than control group. **Conclusion** During the process from hMSC to hOB differentiation, the secretion of OPG increased obviously, and OPGL production decreased significantly. The ratio increasing of OPG/OPGL can be one of mechanisms to

作者单位: 100020 北京,首都医科大学附属北京朝阳医院骨科(杨林、海涌、曲铁兵、周君琳);首都医科大学附属北京朝阳医院科研处(杜心如);哈尔滨医科大学附属第二临床医学院骨科(陶天遵);中国老年学会骨质疏松委员会(刘忠厚)

通讯作者: 杨林, Email: jamesyangl@yahoo.com.cn

regulation of bone remodeling.

Key words: Osteoprotegerin; Osteoprotegerin ligand; Adult; Marrow stromal cells; Osteoblasts

骨重建是骨吸收和骨形成紧密协调的过程,是通过对破骨细胞(osteoclasts, OC)和成骨细胞(osteoblasts, OB)的功能状态进行精密调控来完成的。最近的研究发现,OPGL对破骨细胞的形成是必需的,OPGL活性可以通过与可溶性受体 OPG 相偶联而被中和^[1]。本实验通过人骨髓基质细胞培养和诱导分化,研究骨保护素和骨保护素配体在细胞分化过程中的表达情况,探讨其在骨重建过程中的调节机制。

1 实验方法

1.1 人骨髓基质细胞诱导分化和鉴定

采用梯度离心法获取人骨髓基质细胞(hMSC)并向成骨细胞方向诱导分化;进行细胞形态学观察、细胞内、外碱性磷酸酶和矿化结节检测和鉴定^[2-6]。

1.2 hMSC 分化过程中 OPG 和 OPGL 的表达

1.2.1 OPG 和 OPGL 在 mRNA 水平的表达

在细胞分化的 2、7、14 和 21 天分别提取细胞总 RNA,采用 RT-PCR 法检测细胞中 OPG 和 OPGL 在 mRNA 水平的表达情况。

(1) 细胞总 RNA 抽提:细胞经 PBS 冲洗,加入 TRIzol 1 mL,静置 5 min 后加入氯仿 0.2 mL,离心后吸取上层水相,加入异丙醇,离心弃上清,乙醇洗沉淀,DEPC 处理水 30 μ L 溶解 RNA, -80°C 保存。

(2) 逆转录:RNA 紫外分光光度计检测, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值为 1.7 ~ 2.0 之间, RNA 浓度调整至 $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。每个逆转录反应体积为 20 μ L; 含 $10 \times$ RNA PCR buffer 2 μ L, $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 4 μ L, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP 8 μ L, Oligo dT 50 pmol, Rnasin 20 U, AMV 5 U, 模板 RNA 1 μ g, 补加 DEPC 处理水至 20 μ L。于热循环仪中 42°C 45 min, 95°C 5 min, -20°C 保存。

(3) 聚合酶链式反应:①目的基因为 OPG 和 OPGL,内参照基因为 GAPDH。②OPG 的上游引物为:5'-TCCTGGCACCTACCTAAAACAGCA-3';下游引物为:5'-CTACACTCTCGGCATTCACTTTGG-3';扩增长度为 394 bp;③OPGL 上游引物为 5'-CACACCTCA-CCATCAATGCTCG-3';下游引物为 5'-GAAGGGTTG-GACACCTGAATGC-3';扩增长度为 578 bp;④GAPDH 上游引物为 5'-GGTCGGTGTGAACGGATTTGG-3';下游引物为 5'-ATGTAGGCCATGAGGTCCACC-3';扩增

长度为 983 bp;⑤总反应体积为 50 μ L, 内含 $10 \times$ PCR buffer 5 μ L, 逆转录产物 10 μ L, Taq 酶 1.5 μ L, 上下游引物各 50 pmol, 补加灭菌去离子水至 50 μ L。于热循环仪中 95°C 3 min, 再进行 95°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 共 30 个循环,最后 72°C 延伸 5 min, 4°C 保存。

(4) 琼脂糖凝胶电泳:用 2% 琼脂糖凝胶,每个泳道上样量为 PCR 产物 10 μ L。在 70 V 恒压条件下电泳后再经过溴化乙锭染色,最后将凝胶置于凝胶成像分析系统中检测各条带的光密度 A 值,并且求出与内参照基因 GAPDH 的光密度比值。

1.2.2 OPG 在蛋白质水平的表达

hMSC 以每孔 1×10^5 密度接种在六孔培养板内,分化培养,在第 2、7、14 和 21 天时收集细胞,提取细胞总蛋白,采用 Western blot 法测定细胞中 OPG 蛋白质表达情况。

1.3 统计学分析

研究中数据用均值 $\pm$ 标准误表示。采用统计学分析软件 SPSS 系统对数据进行统计学处理, $P < 0.05$, 具有统计学意义。

2 结果

2.1 hMSC 向 OB 的分化

电镜观察显示获得的 hMSC 生长状况良好,生化指标稳定;经分化培养液培养的细胞增殖速度明显减慢,生长状态平稳。细胞在分化培养过程中,上清液中碱性磷酸酶分泌明显增加,细胞 ALP 染色明显浓染,随时间呈显著增强趋势;采用常规培养液培养的 hMSC,在汇合后不能形成明显的矿化结节。采用分化培养液培养的 hMSC,在 14 天时开始出现矿化结节,在 21 天时呈现密集的茜素红染色矿化结节。

2.2 OPG 和 OPGL 在 hMSC 分化过程中的表达

2.2.1 在 mRNA 水平的表达

在 hMSC 分化过程中,OPG mRNA 水平明显提高,分化至第 21 天时达到高峰,约为未分化时水平的 2.5 倍。统计学分析, $P < 0.01$, 差异有显著性。

hMSC 在分化过程中,在相同的时间点 OPGL mRNA 水平显著下降,分化至第 21 天时水平约为未分化时水平的 1/2。统计学分析, $P < 0.01$, 差异有显著性。见图 1。

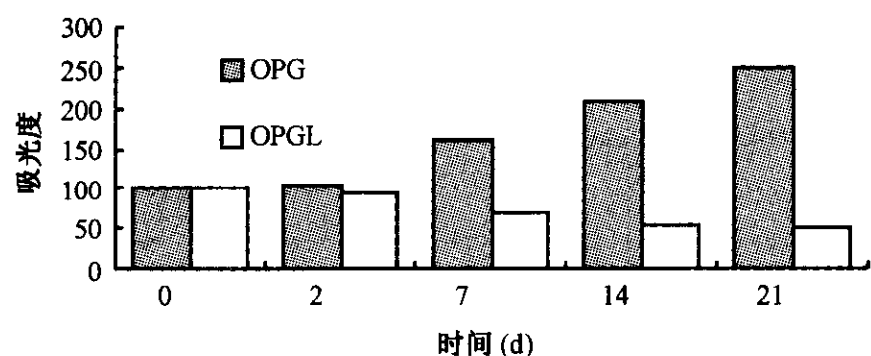


图 1 OPG 和 OPGL 在 mRNA 水平的表达

2.2.2 在蛋白质水平的表达

在 hMSC 分化过程中, OPG 蛋白质表达水平明显提高。第 21 天时 OPG 的蛋白质表达水平约为未分化时水平的 6 倍。统计学分析, $P < 0.01$, 差异有显著性。见图 2。

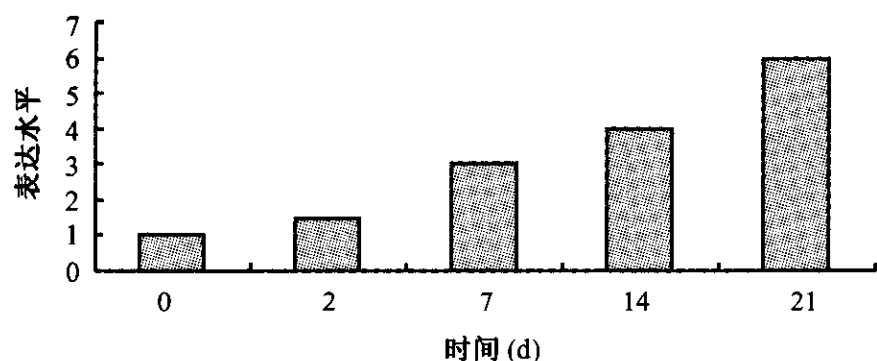


图 2 OPG 在蛋白质水平的表达

3 讨论

众所周知, OPG 可由 OB 产生, 具有抑制 OC 形成和成熟的作用。OPGL 作为 OPG 的中和性配体, 促进 OC 的形成和分化, 并且可以使成熟 OC 活性提高数倍。OPGL 以水溶性或膜联性两种形式存在, 通过 OC 与其相应受体 RANK 连接来发挥它的生物学效能, 同时 RANK 也需要这种细胞→细胞间的接触来发挥相互作用。当 OPGL 与 OPG 结合时, 这种作用就会受到削弱。在 M-CSF 存在的情况下, OPGL 对 OC 的形成是必需的。笔者认为在骨的微环境中, OPGL 的生物学效能可能与 OPG/OPGL 的比值有关。以往研究显示多种钙调节激素和细胞因子是通过影响 OPG 和 OPGL 的表达发挥调节骨吸收的作用, 并且这种作用均可被中和性抗体所阻断。OPG 和 OPGL 系统可能是机体调节骨吸收过程的一种共同途径^[7-9]。

本实验对 OPG 和 OPGL 在 hMSC 分化过程中的表达情况进行了研究。实验发现, hMSC 在分化 21 天后, OPG 和 OPGL 含量发生显著变化。在 hMSC 分化早期 OPGL 表达水平较高, 在向 OB 方向分化过程中 OPGL 表达逐渐减少; 同时 OPG 的表达逐渐增多。

实验结果显示 OPG/OPGL 比值在 hMSC 向 hOB 分化过程中是不断变化的, 呈现明显的增大趋势。我们推测在 MSC 向 OB 分化早期, OPG 分泌较少, 而 OPGL 含量较高, OPG/OPGL 比值低, 对 OC 抑制作用较小, 主要表现为骨的吸收; 在 MSC 不断分化成熟为 OB 的过程中, OPG 分泌不断增加, OPGL 含量逐渐减少, OPG/OPGL 比值提高, 从而对 OC 的抑制作用显著增强, 最终导致骨形成作用的增强。

以往研究发现当体外培养的 OB 中加入 OPGL 时, OB 对 OC 形成的抑制作用就会明显减退, 并且 MSC 对 OC 形成的影响可不依赖于 M-CSF 的存在, 这从另一方面支持了笔者的推测。通过本实验, 笔者认为 OPG/OPGL 含量比值是决定 OB 和 OC 功能状态的一个重要因素。科研人员曾通过 RT-PCR 检测了基质细胞和 OB 细胞系的 OPG 和 OPGL 的 mRNA 表达水平, 发现人白血病 HL60 细胞系依赖于 OPG/OPGL 比值的变化才能向 OC 方向分化, 并且 HL60 细胞系不需要 M-CSF 的存在就可以分化成 OC^[10-12]。

综上所述, 本实验结果表明, 在体外 hMSC 向 hOB 分化过程中 OPG 表达水平显著提高, OPGL 表达水平明显下降, 从而导致 OPG/OPGL 比值显著增高, 对 OC 的抑制作用明显增强。我们认为 OPG/OPGL 含量比值在骨重建中可能具有重要的调节作用, 调控着 OB 和 OC 的分化顺序和功能状况, 从而协调骨重建周期的顺利进行。

【参 考 文 献】

- [1] Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, et al. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone*, 1999, 25 (5): 517-523.
- [2] Yang Lin, Tao Tianzun, Liuzhonghou. Human marrow stromal cells culture and differentiating into osteoblasts in vitro. *Chin J Osteoporos*, 2007, 13(4): 256-259.
- [3] Yang Lin, Tao Tianzun, Liu fengchen, et al. Experimental study: the effect of dexamethasone on the adult osteoblast proliferation and differentiation. *Chin J Orthop*, 2001, 21(8): 493-497.
- [4] Yang Lin, Tao Tianzun, Wang Xinting, et al. The effects of dexamethasone on proliferation, differentiation and apoptosis of adult human osteoblasts in vitro. *Chin Med J*, 2003, 116(9): 1357-1360.
- [5] Yang Lin, Tao Tianzun, Zhang Shuyun, et al. The effects of Chinese traditional medicine Liu-OGN on proliferation and differentiation of adult human osteoblasts in vitro. *Chin J Trad Med Traum & Orthop*, 2002, 10(1): 1-3.
- [6] Yang Lin, Tao Tianzun, Zhang Shuyun, et al. The effects of Chinese

- traditional medicine Liu-OCN on proliferation and differentiation of adult human osteoblasts *in vitro*. Chin J Trad Med Traum & Orthop, 2002, 10(1): 4-7.
- [7] Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. Endocrinology, 1999, 140(10): 4382-4389.
- [8] Fink T, Abildtrup L, Fogd K, et al. Induction of adipocyte-like of phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia. Stem Cell, 2004, 22:1346-1355.
- [9] Fukuoka H, Aoyama M, Miyazawa K, et al. Hypoxic stress enhances osteoclast differentiation via increasing IGF2 production by non-osteoclastic cells. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328: 885-894.
- [10] Chikatsu N, Takeuchi Y, Tamura Y, et al. Interactions between cancer and bone marrow cells induce osteoclast differentiation factor expression and osteoclast-like cell formation *in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 267(2): 632-637.
- [11] Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ, et al. Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. Endocrinology, 1999, 140(10): 4451-4458.
- [12] Tarkowski M. Expression and function of CD30 on T lymphocytes. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 1999, 47(4): 217-221.

(收稿日期: 2007-02-26)