

· 药物研究 ·

染料木黄酮对成骨细胞 C-fos、ALP 及骨钙蛋白基因表达的影响

时青云 闫琦 徐苗

摘要: **目的** 研究不同浓度的染料木黄酮(genistein, GEN)对体外培养大鼠成骨细胞 C-fos、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)及骨钙蛋白(osteocalcin)基因表达的影响。**方法** 采用新生大鼠颅骨分离培养成骨细胞,加入不同浓度的染料木黄酮(10^{-8} mol·L⁻¹、 10^{-7} mol·L⁻¹、 10^{-6} mol·L⁻¹、 10^{-5} mol·L⁻¹),以妊马雌酮(商品名:倍美力)(10^{-8} mol·L⁻¹、 10^{-7} mol·L⁻¹、 10^{-6} mol·L⁻¹、 10^{-5} mol·L⁻¹)作为阳性对照组,提取总 RNA, RT-PCR 半定量分析其表达。**结果** 染料木黄酮对成骨细胞 C-fos、ALP 及骨钙蛋白基因水平的影响呈正相关性,并与其剂量成正相关性,但这些作用均低于雌激素水平($P < 0.05$)。**结论** 染料木黄酮能诱导成骨细胞 C-fos、ALP 及骨钙蛋白基因的表达,并与其浓度有关,作用与雌激素相似。

关键词: 染料木黄酮; 成骨细胞; 骨钙蛋白; C-fos; ALP

Effect of genistein on gene expression of C-fos, ALP and osteocalcin in cultured rat osteoblasts SHI

Qingyun, YAN Qi, XU Miao. Department of Obstetrics and Gynecology, Beijing Friendship Hospital Affiliated with Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China

Abstract: **Objective** To study the effect of different concentrations of genistein on gene expression of C-fos, ALP and osteocalcin in cultured rat osteoblasts. **Methods** Newborn rat calvarid osteoblastic cell were isolated and cultured. They were cultured in medium with various concentrations genistein(10^{-8} mol·L⁻¹, 10^{-7} mol·L⁻¹, 10^{-6} mol·L⁻¹, 10^{-5} mol·L⁻¹) and estrogen group(10^{-8} mol·L⁻¹, 10^{-7} mol·L⁻¹, 10^{-6} mol·L⁻¹, 10^{-5} mol·L⁻¹). The total RNA was extracted by TRIZOL and analyzed with semi-quantitative RT-PCR. **Results** Genistein can increase expression of C-fos, ALP and osteocalcin in cultured rat osteoblasts. The correlation of genistein of different concentration with C-fos, ALP and osteocalcin in cultured rat osteoblasts were positive. But, the effect was weaker than these of estrogen group. ($P < 0.05$). **Conclusion** The genistein could increase expression of C-fos, ALP and osteocalcin. The effect was similar to estrogen but weaker than that of estrogen.

Key words: Genistein; Osteoblast; Osteocalcin; C-fos; ALP

C-fos 基因是即刻早期基因家族中的成员。近年来的国内外研究表明, C-fos 基因与成骨细胞关系密切, 是骨细胞生长和分化的关键调节因子, 在正常发育和骨疾病中对成骨细胞和破骨细胞系产生影响。激素、细胞因子以及外力等均可诱导 C-fos 基因在骨组织中的表达^[1]。ALP 是早期细胞分化的标志, 在骨钙化之前与骨细胞的合成有关, 骨钙蛋白由

成熟的成骨细胞表达, 与骨钙化形成有关。染料木黄酮(genistein)是豆类及其制品中含量较多的一类植物雌激素, 具有雌激素样和抗雌激素样作用, 研究已发现, 染料木黄酮与骨代谢调节因子相互作用, 对骨代谢产生影响。

为进一步了解染料木黄酮对骨的作用, 本研究通过体外培养成骨细胞的方法, 观察染料木黄酮对成骨细胞 C-fos、ALP 及骨钙蛋白基因表达的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

腺苷酸环化酶(cAMP, 美国 Sigma 公司), ³H-cAMP(上海核技术开发公司), 磷酸二酯酶(PDE, 华

项目基金: 北京市优秀人才基金(2003 年)

作者单位: 100050 北京, 首都医科大学附属北京友谊医院妇产科(时青云); 北京海淀妇幼保健院(闫琦); 中国药品生物制品检定所(徐苗)

通讯作者: 时青云, Email: shiqingyun1@163.com

美生物技术公司),标准 CaM(电泳纯),蛇毒(Crotalus atrox),染料木黄酮(美国 Sigma 公司),倍美力(妊马雌酮)25 mg/5mL,惠氏-立达中国有限公司,ALP、ATP(美国 Sigma 公司),胰蛋白酶(美国 Sigma 公司),Fluo-3AM(Eugene OR),RNA 试剂盒(美国 GIBCO),逆转录酶为 Roche 公司。

1.2 实验动物

普通级 SD 大鼠,体重 220 g ~ 250 g,由动物实验中心提供。

1.3 细胞培养及鉴定

取出生 24 h 内 SD 大鼠 24 只,每组 8 只大鼠,置入 75%酒精中浸泡消毒 10 min,无菌操作下取出完整颅盖骨。细胞培养按参考文献^[2]方法进行。取第 2 代细胞进行实验。成骨细胞鉴定:钙-钴法染色呈强阳性。

1.4 实验分组

实验分为正常对照组(control 组),GEN 各组(10^{-8} mol·L⁻¹、 10^{-7} mol·L⁻¹、 10^{-6} mol·L⁻¹、 10^{-5} mol·L⁻¹的染料木黄酮),阳性对照组(10^{-8} mol·L⁻¹、 10^{-7} mol·L⁻¹、 10^{-6} mol·L⁻¹、 10^{-5} mol·L⁻¹的倍美力),分别按浓度配制成相应培养液培养。

1.5 基因表达的检测

取第 2 代培养细胞,将细胞悬液按细胞密度为 2×10^6 个/mL 密度种植于 24 孔板内(预先放置载玻片),实验用培养 3 d 的细胞。获得细胞悬液后用 TRIZOL(美国 GIBCO 公司)提取总 RNA,oligo(Dt)作为引物,进行逆转录,逆转录酶为 Roche 公司产品,PCR 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列表

基因	引物
C-C-fos	上游引物 5-TGCATGAATTCCCCAGCCGACTCCTTCTCCA-3'
	下游引物 5-TGCATAAGCTTCAGCTCCCTCCTCCGATTCC-3'
ALP	上游引物 5-TGCATGAATTCCCTGCCTTACCAACTCATTT-3'
	下游引物 5-TGCATAAGCTTGAGAGCCACAAAGGGAAGT-3'
Osteocalcin	上游引物 5-TGCATGAATTCGACCTAGCAGACACCATGAG-3'
	下游引物 5-TGCATAAGCTTGCTCCAAGTCCATTGTTGA-3'
GAPDH	上游引物 5-TGCATGAATTCTGATTCTACCCACGGCAAGT-3'
	下游引物 5-TGCATAAGCTTGTCATGAGCCCTTCCACGAT-3'

PCR 反应体系总体积为 20 μ L,其中 DNA 50 ng, Mg^{2+} 2.5 mmol·L⁻¹,Dntp 1 μ L,引物各 pmol, Taq 酶 2.5 U/管。按下列条件进行扩增循环:首先 95℃ 预变性 4 min,然后 95℃ 变性 30 s,各对引物分别 60℃ 或 68℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,共 30 个循环。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后进行光密度扫描,并以 GAPDH 为内参照校正作相对量分析,以 GAPDH 光密度扫描数值为 100%,以两者之积分吸

光度比值百分数表示。

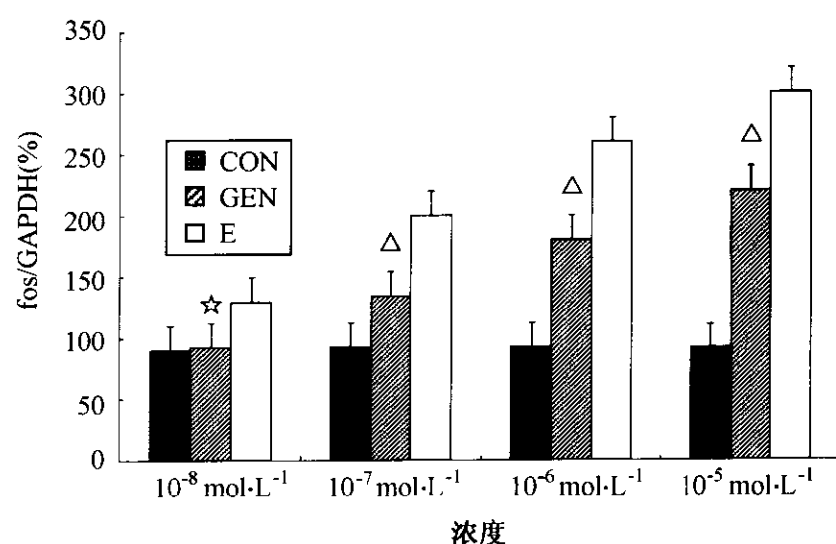
1.6 统计学处理

数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间差异显著性检验用方差分析,组间两两比较用 Q 检验。

2 结果

2.1 不同浓度的染料木黄酮、雌激素对成骨细胞 C-fos 基因表达的影响

染料木黄酮浓度在 1×10^{-8} mol·L⁻¹时,GEN 组与对照组相比 C-fos 的 mRNA 含量无明显变化($P > 0.05$),但随着浓度的升高,GEN 组 C-fos 的 mRNA 含量水平升高,对其浓度的影响与剂量成正相关。雌激素在浓度为 1×10^{-8} mol·L⁻¹时即能增加 C-fos 的 mRNA 含量,雌激素在浓度为 1×10^{-7} mol·L⁻¹时与染料木黄酮浓度为 1×10^{-5} mol·L⁻¹时 C-fos 的 mRNA 含量相比无明显差异($P > 0.05$)。随着雌激素浓度的增加,C-fos 的 mRNA 含量水平明显增加,增加的程度明显高于染料木黄酮相对应的各浓度水平钙调素增加量($P < 0.05$)。见图 1。



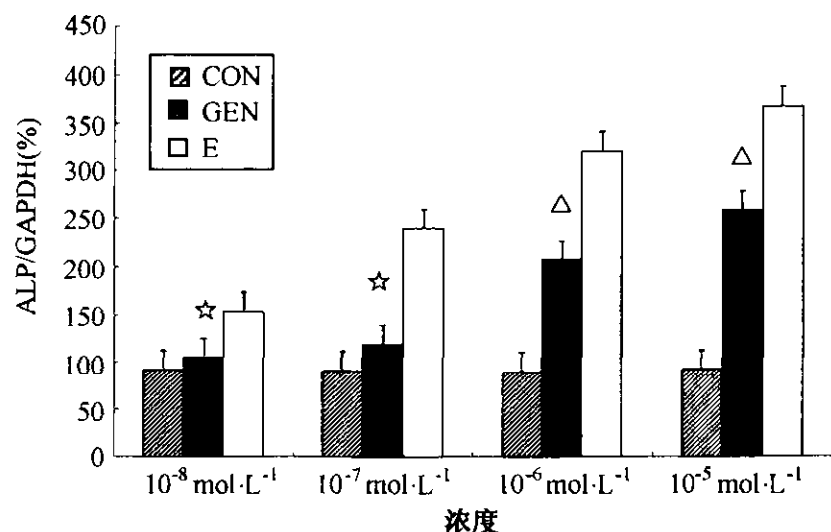
注:与对照组相比 $\star P > 0.05$, $\wedge P < 0.05$;与阳性对照组(E 组)相比 $\star\wedge P < 0.05$;雌激素在浓度为 1×10^{-7} mol·L⁻¹时与染料木黄酮浓度为 1×10^{-5} mol·L⁻¹时 C-fos 的 mRNA 含量相比无明显差异($P > 0.05$)

图 1 不同浓度的染料木黄酮、雌激素对成骨细胞 C-fos 基因表达的影响

2.2 不同浓度的染料木黄酮、雌激素对成骨细胞 ALP 基因表达的影响

染料木黄酮浓度在 1×10^{-8} mol·L⁻¹、 1×10^{-7} mol·L⁻¹时与对照组相比 ALP 的 mRNA 含量无明显变化($P > 0.05$),但随着浓度的升高,ALP 的 mRNA 水平升高,对其浓度的影响与剂量成正相关;雌激素在浓度为 1×10^{-8} mol·L⁻¹时,与对照组相比 ALP 的 mRNA 含量有增加,随着浓度的升高,ALP 的水平升高,对其浓度的影响与剂量成正相关性。雌

激素在浓度为 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时与染料木黄酮浓度为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 ALP 的 mRNA 含量相比无明显差异 ($P > 0.05$)。见图 2。



注:与对照组相比 $\star P > 0.05$, $\Delta P < 0.05$;与阳性对照组比 $\star\Delta P < 0.05$

图 2 不同浓度的染料木黄酮、雌激素对成骨细胞 ALP 基因表达的影响

雌激素,结构和分子量与雌二醇类似,其雌激素活性为雌二醇的 0.001% ~ 0.1%,具有抗雌激素样和雌激素样作用。研究已发现,染料木黄酮与骨代谢调节因子相互作用,对骨代谢产生影响^[3]。

已在前期研究中发现一定浓度的染料木黄酮对成骨细胞内钙离子、钙调素水平、钙 ATP 酶、ALP 活性发生作用。本研究从基因水平进一步探讨染料木黄酮对成骨细胞 C-fos、ALP 及骨钙蛋白基因表达的影响。

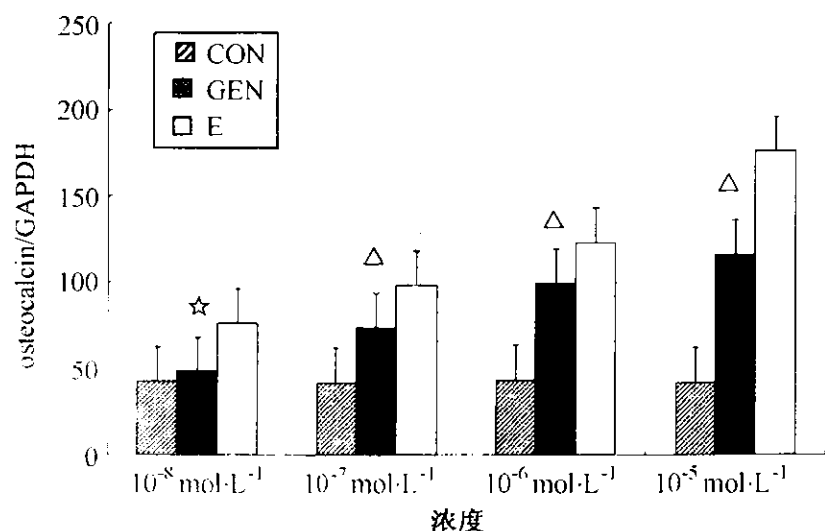
C-fos 基因是即刻早期基因家族中的一员,对维持细胞正常生理功能,调节细胞生长与增生起着重要作用。它调节细胞周期的启动,对维持细胞持续分裂发挥效应^[4]。C-fos 基因的表达与成骨细胞的增殖有关,是骨细胞生长和分化的关键调节因子,在正常发育和骨疾病中对成骨细胞系产生影响。C-fos 基因表达的调控机理至今尚不十分清楚。研究发现,激素、细胞因子以及外力等均可诱导 C-fos 基因在骨组织中的表达。染料木黄酮作为植物雌激素,它可激活细胞内的信号传导通路,导致激酶的激活、转录因子的活化及基因的转录。本研究发现染料木黄酮浓度在 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,GEN 组与对照组相比 C-fos 的 mRNA 含量无明显变化 ($P > 0.05$),但随着浓度的升高,GEN 组 C-fos 的 mRNA 含量水平升高,对其浓度的影响与剂量成正相关。雌激素在浓度为 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时即能增加 C-fos 的 mRNA 含量,雌激素在浓度为 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时与染料木黄酮浓度为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 C-fos 的 mRNA 含量相比无明显差异 ($P > 0.05$)。随着雌激素浓度的增加,C-fos 的 mRNA 含量水平明显增加,增加的程度明显高于染料木黄酮相对应的各浓度水平钙调素增加量 ($P < 0.05$)。研究结果表明,染料木黄酮在一定的浓度下与雌激素一样可以诱导 C-fos 基因的表达,对骨细胞产生作用。

GADPH 基因被用来校正转录水平之间的差异,研究中同时测定所有样本中的 GADPH 表达水平,一些研究中应用 $\text{ng} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ GADPH 为单位来表达基因表达水平,本研究以 GAPDH 光密度扫描数值为 100%,以两者之积分吸光度比值百分数表示。

ALP 是成骨细胞分化时所分泌的酶,是成骨细胞分化和功能的标志,在骨钙化之前与骨细胞的合成有关,能够反映成骨细胞合成 I 型胶原、形成骨基质的能力。活性成骨细胞在早期发育的阶段内就富含 ALP, ALP 的活性反应了成骨细胞的成骨活性^[5]。前期研究发现,较高剂量的染料木黄酮可以提高成

2.3 不同浓度的染料木黄酮、雌激素对成骨细胞 Osteocalcin 基因表达的影响

同样,染料木黄酮浓度在 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时与对照组相比 Osteocalcin mRNA 含量无明显变化 ($P > 0.05$),但随着浓度的升高,Osteocalcin 表达水平升高,对其浓度的影响与剂量成正相关;雌激素在浓度为 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,Osteocalcin mRNA 的含量与对照组相比有增加,随着浓度的升高表达水平升高,对其浓度的影响与剂量成正相关。增加的程度明显高于染料木黄酮相对应的各浓度水平的增加量。见图 3。



注:与对照组相比 $\star P > 0.05$, $\Delta P < 0.05$;与阳性对照组比 $\star\Delta P < 0.05$

图 3 不同浓度的染料木黄酮、雌激素对成骨细胞 Osteocalcin 基因表达的影响

3 讨论

染料木黄酮是豆类及其制品中含量较多的植物

骨细胞的 ALP 活性。本研究发现,染料木黄酮浓度在 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时与对照组相比 ALP 的 mRNA 含量无明显变化 ($P > 0.05$),但随着浓度的升高,ALP 的 mRNA 水平升高,对其浓度的影响与剂量成正相关;雌激素在浓度为 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,与对照组相比 ALP 的 mRNA 含量有增加,随着浓度的升高,ALP 的水平升高,对其浓度的影响与剂量成正相关性。雌激素在浓度为 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时与染料木黄酮浓度为 $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 ALP 的 mRNA 含量相比无明显差异 ($P > 0.05$)。本研究进一步从基因水平证实染料木黄酮可以促进成骨细胞的合成。

骨钙蛋白是由分化成熟的成骨细胞分泌的一种非胶原骨基质蛋白,其基因调节需在胶原合成基础上进行,在基质矿化期开始分泌,合成高峰与 ALP 活性高峰一致,与骨钙化形成有关,其确切功能目前尚不清楚,但它是骨形成的决定因素,能够调节矿物质形成的速率和方向,是成骨细胞的唯一特异性生化指标^[6]。本研究发现,染料木黄酮浓度在 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时与对照组相比 Osteocalcin mRNA 含量无明显变化 ($P > 0.05$),但随着浓度的升高,Osteocalcin 表达水平升高,对其浓度的影响与剂量成正相关;雌激素在浓度为 $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,与对照组相比 Osteocalcin mRNA 的含量有增加,随着浓度

的升高表达水平升高,对其浓度的影响与剂量成正相关。增加的程度明显高于染料木黄酮相对应的各浓度水平的增加量。

本研究结果表明,染料木黄酮不但对成骨细胞内钙信号转导具有一定的调节作用,同时还可通过诱导相关基因的表达,对成骨细胞产生影响。

【参 考 文 献】

- [1] Chow JW, Fox S, Jagger CJ, et al. Role for parathyroid hormone in mechanical responsiveness of rat bone. *Am J Physiol*, 1998, 274(1): E 146-E 154.
- [2] 王洪复,主编. 骨细胞图谱与骨细胞体外培养技术. 上海科学技术出版社, 2002. 127-130.
- [3] Albertazzi P. Purified phytoestrogens in postmenopausal bone health: is there a role for genistein? *Climacteric*, 2002, 5(2): 190-196.
- [4] Paul J, Kostenuik, Bernard P, Halloran, Emily R, Morey-Holton, et al. Skeletal unloading inhibits the in vitro proliferation and differentiation of rat osteoprogenitor cells. *Am J Physiol*, 1997, 238 (6pt 1): E 1133-E 1139.
- [5] Effenberger KE, Johnsen SA, Monroe DG, et al. Regulation of osteoblastic phenotype and gene expression by hop-derived phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005, 11: 427-431.
- [6] Choi JY. Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *J CELL Biochem*, 1996, 61(4): 609-618.

(收稿日期: 2007-03-20)