

胰岛素和胰岛素样生长因子对人成骨样细胞 MG63 骨钙素基因表达的影响

马艳芬 李万根 陈澍

摘要：目的 在一定条件下对人成骨样细胞 MG63 进行体外培养，并用胰岛素、胰岛素样生长因子-1 (Insulin like growth factor-1, IGF-1) 进行干预，以 17- β 雌二醇做阳性对照。观察药物干预对 MG63 细胞骨钙素基因表达的影响。为糖尿病性骨质疏松的治疗提供理论和实验依据。方法 用 DMEM 培养基培养 MG63 细胞，并以胰岛素、IGF-1、雌二醇进行干预。抽提各样本总 RNA 后，行逆转录并对骨钙素的 cDNA 进行荧光扩增和定量。结果 各药物组内基因拷贝数差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)，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，各药物组的最高药效浓度均为所用的最高药物浓度，分别为 200 nmol/L、100 nmol/L、1000 nmol/L。3 组药物的骨钙素拷贝数增长率比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，胰岛素组的拷贝数增长率明显高于雌二醇组和 IGF1 组 ($P < 0.05$)，IGF-1 与雌二醇组拷贝数增长率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 胰岛素、IGF-1 和雌二醇一样，均有显著促进 MG63 分化的作用。

关键词：胰岛素；IGF-1；MG63 细胞；分化

The effects of Insulin and IGF-1 on expression of bone gla protein of human osteoblast-like cell line MG63

MA Yanfen, LI wangen, CHEN Shu. Department of Gereology, Second Affiliated Hospital Of Guangzhou Medical College. Corresponding author: MA Yan-fen Department of Indocrinology, Capital Medical University Daxing Hospital, Beijing 102600, China

Abstract: Objective To investigate the effect of insulin and insulin like growth factor-1 (IGF-1) on the express of bone gla protein (osteocalcin) of osteoblast-like cell line MG63, 17- β estradiol were used as the contrast medicine. This experiment focuses on exploring the pathogenesis of the osteoporosis and providing the experimental basis for the treatment of the osteoporosis of diabetes. **Methods** The MG63 cells (10^5 /mL) were seeded into the DMEM medium. Then the cultured MG63 were exposed to insulin, IGF-1 and 17- β estradiol for 48 hours with 0.1% bovine serum albumin phenol-free DMEM. The total RNA of every sample was extracted and then do reverse transcriptions to gate the cDNA chains of genes of bone gla protein. Fluorescence real time quantitative PCR assay was carried out to examine the mRNA expression of bone gla protein. The nest primers were used in the PCR assay. The statistics of results were performed by software of SPSS 11.0. ANOVA and post hoc statistical analyses were used to determine differences among treatments ($P < 0.05$). **Results** The expression of mRNA copys for bone gla protein was significantly different inside the groups of Insulin, IGF-1 and 17- β estradiol ($P < 0.05$). The effect of every medicine increased dose-dependently. The best medical effect concentrations of Insulin, IGF-1 and 17- β estradiol is the highest medical effect concentrations of every group (200 nM, 100 nM, 1000 nM respectively) in this experiment. The increase rates of bone gla protein mRNA copy of Insulin, IGF-1 and 17- β estradiol were dramatically different ($P < 0.05$). The increase rate of Insulin group was significantly higher than that of IGF-1 and 17- β estradiol groups ($P < 0.05$) and there were no significant difference between IGF-1 and 17- β estradiol ($P > 0.05$). **Conclusion** like 17- β estradiol, insulin and IGF-1 improved the differentiation function of MG63.

基金项目：广东省自然科学基金项目(000333)

作者单位：510260 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 首都医科大学大兴医院内分泌科)

通讯作者：马艳芬, Email: lilymyf@sohu.com

Key words: Insulin; IGF-1; MG63 cell; Differentiation

糖尿病(diabetes mellitus)是遗传和环境因素相互作用而引起的疾病。由于体内胰岛素分泌绝对或相对不足及靶细胞对胰岛素敏感性减低,使体内血糖升高,而导致机体糖类、蛋白质及脂肪代谢紊乱,长期患病者可发生骨代谢紊乱,表现为骨质疏松。据统计,糖尿病患者约半数以上的患者发生骨质疏松。俞文华等^[1]用胰岛素样生长因子-1(IGF-1)对大鼠的成骨样细胞 ROS 17/2.8 进行干预,结果显示,与增殖有关的原癌基因及骨钙素的 mRNA 表达明显增强。IGF-1 与胰岛素原有 60% 的结构同源性且具有胰岛素样作用,笔者通过对骨钙素 mRNA 的基因扩增,观察 IGF-1、胰岛素对人成骨样细胞 MG 63(简称 MG 63 细胞)骨钙素 mRNA 表达的影响,并以 17- β 雌二醇(雌二醇)做阳性对照,探讨骨质疏松的发生机制并观察胰岛素这一糖尿病的常用药物及 IGF-1,是否与雌二醇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

培养方法参照[2]所用方法。MG 63 细胞(购自美国 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 2.5×10^4 /mL 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 种浓度的胰岛素(Lily 公司)、IGF-1(Sigma 公司)、雌二醇(Sigma 公司)分别加入 6 孔板中,各药物干预 MG 63 浓度(单位均为 nmol/L)分别为胰岛素:0、10、50、200;IGF-1:0、1、20、100;雌二醇:0、0.1、10、1000。其中 0 浓度组为空白对照(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 标准曲线的建立及骨钙素 mRNA 的实时荧光定量 PCR 测定

标准曲线的做法参照[3]所用方法,且应有阴性

对照(NEGA 组)。根据目的基因骨钙素和管家基因三磷酸甘油醛脱氢酶的 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),骨钙素采用巢式引物,骨钙素-1 为外围引物,骨钙素-2 为基本引物。其引物和 TaqMan 探针序列分别为:骨钙素-1 前向引物 5'-AGGTGCGAAGCCCAGCGGT-3',骨钙素-1 逆向引物 5'-ACTGGGGCTCCCAGCCATT-3',扩增产物为 120 bp;骨钙素-2 前向引物 5'-AGCAAAGGTGCAGCCTTTGT-3',骨钙素-2 逆向引物 5'-GGCCTGGGTCTCTTCACT-3',扩增产物为 63 bp, TaqMan 探针 5'-FAM-CCAAGCAGGAGGGCAGCGAGG-TAMRA-3' (21 bp);三磷酸甘油醛脱氢酶前向引物 5'-CCATCAATGACCCCTTCATTG-3',逆向引物 5'-CATGGGTGGAATCATATTGGAAC-3',扩增产物为 65 bp, FAM-MGB 探针 5'-CCTCAACTACATgGTTTAC-3' (19 bp)。另外,以三磷酸甘油醛脱氢酶做阳性对照,NEGA 组体系中不加模板 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,取骨钙素的 cDNA 5 μL 进行普通 PCR 扩增,所用 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(见图 1),横坐标代表循环数,显示了起始 CT 值,纵坐标 Delta Rn 为平台期荧光强度与检测临界数值之差, Rn: 一个反应管经 n 次热循环后,测得的荧光强度。各梯度的阳性标准品荧光扩增后在荧光 PCR 仪上产生 5 条标准曲线,其代表阳性标准品的拷贝数与 CT 值的关系[相关系数(R) = 0.997]。

首先取各样本骨钙素 cDNA 5 μL 进行巢式反映体系的外扩增,应用普通 PCR 方法,引物为骨钙素-1 前向引物和骨钙素-1 逆向引物,共 20 个循环。取外扩增产物 5 μL ,骨钙素-2 前向引物,骨钙素-2 逆向引物,及 Taq Man 探针行巢式反映体系的内扩增(荧光定量 PCR),反应条件:93℃ 2 min,然后 93℃ 1 min,55℃ 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、三磷酸甘油醛脱氢酶组及 NEGA 组一并放入 7000 型荧光 PCR 仪(ABI 公司)的相应孔内进行荧光定量扩增,每样本作 3 遍。反应

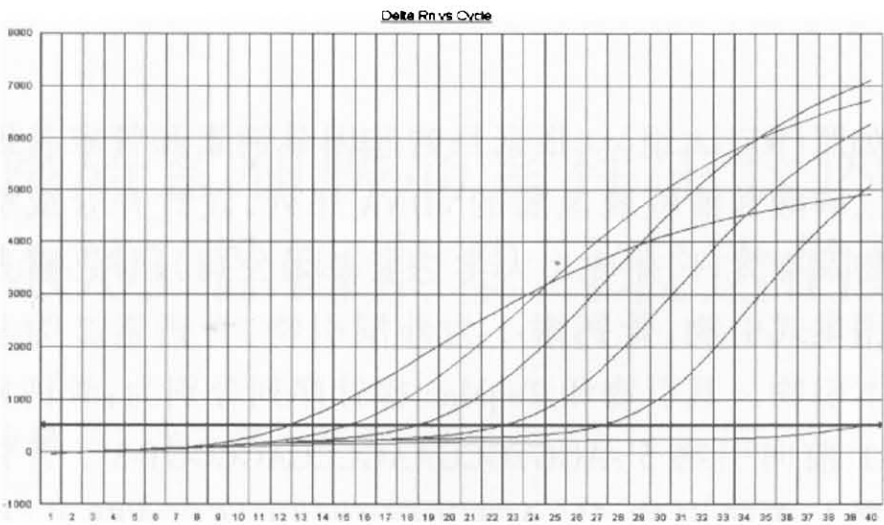


图 1 标准曲线

结束后,由电脑自动分析并计算出各样本的基因拷贝数。

三磷酸甘油醛脱氢酶 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 统计学处理

用 SPSS 11.0 软件进行统计分析并作图。所有数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用各样本拷贝数/三磷酸甘油醛脱氢酶 mRNA 拷贝数的结果进行各药物组内及组间的比较。采用随机区组设计方差分析(F 检验)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 3。图中共 12 条曲线,上面 10 条曲线为各样本骨钙素 mRNA 扩增曲线,最下面一条为 NEGA 组,其上一条为三磷酸甘油醛脱氢酶对照,NEGA 组曲线几乎与基线平行,说明体系中不存在 PCR 污染。

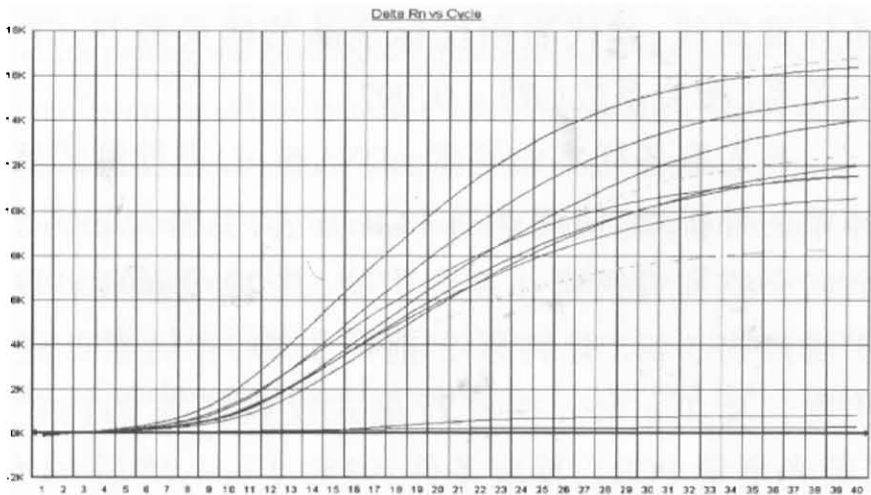


图 2 各样本骨钙素荧光扩增曲线

检测结果显示:各组内不同药物浓度间骨钙素 mRNA 拷贝数有显著差异(P 均 < 0.05);胰岛素、

IGF-1、雌二醇 的各药物组的最高药效浓度均为所用的最高药物浓度,分别为 200 nmol/L、100 nmol/L、1000 nmol/L;三种药物在达到最高药效浓度前,其 mRNA 拷贝数随药物浓度的增加而呈逐渐增加趋势。见表 1。

表 1 各药物组内不同药物浓度的骨钙素 mRNA 拷贝数变化($\bar{x} \pm s$)

组别	药物浓度			
	C1(CON)	C2	C3	C4
胰岛素	3597 ± 1501 [#]	3607 ± 1597 [#]	9133 ± 4747 [#]	16502 ± 81 ^{#§}
IGF-1	3597 ± 1501 [#]	4833 ± 1328 [#]	4359 ± 548 [#]	7182 ± 1707 ^{#§}
雌二醇	3597 ± 1501 [#]	4630 ± 420 [#]	9762 ± 646 ^{#§}	8405 ± 1447 ^{#§}

注: * 为本试验的最高药效浓度,与 CON 组比较[§] $P < 0.05$,与最高药效浓度比较[#] $P < 0.05$

计算不同药物干预后骨钙素 mRNA 拷贝数的增长率,胰岛素、IGF-1、雌二醇 3 组的骨钙素 mRNA 拷贝数的增长率分别为 $359.6 \pm 10.1\%$ 、 $99.3 \pm 10.7\%$ 、 $132.5 \pm 10.9\%$,3 组间存在显著性差异($F = 105$, $P < 0.05$),根据 SPSS 各样本均数间多重比较的结果显示,胰岛素组拷贝数增长率明显大于 IGF-1 和雌二醇组,结果有统计学差异,IGF-1 和雌二醇组比较无统计学差异见图 3。

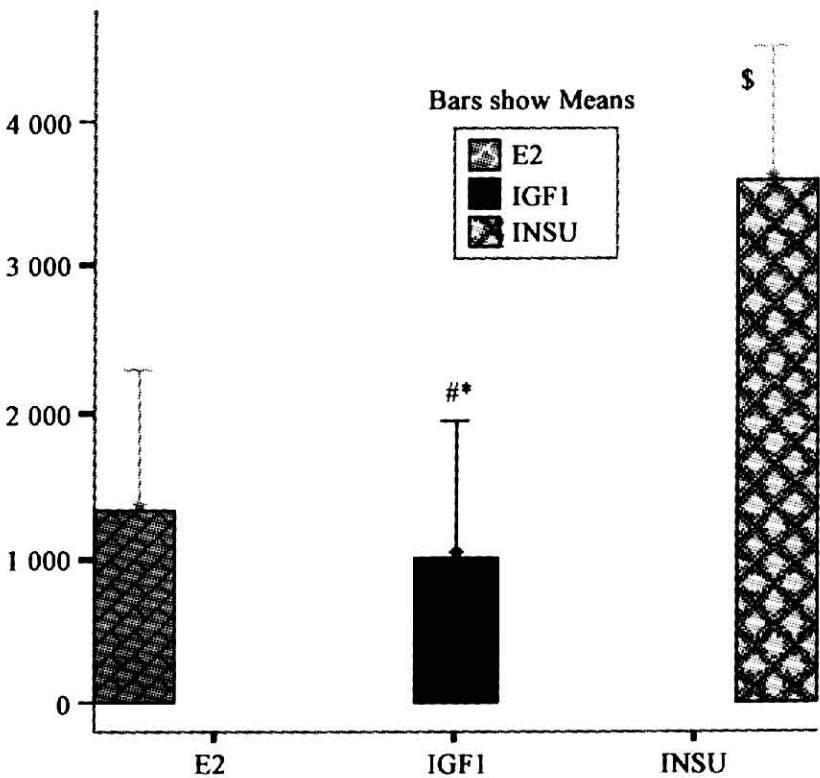


图 3 各药物组间骨钙素 mRNA 拷贝数的增长率变化
注: E₂ 为雌二醇,INSU 为胰岛素,与 E₂ 比较[§] $P < 0.05$,与 E₂ 比较[#] $P > 0.05$,与 INSU 比较[#] $P < 0.05$

3 讨论

本实验的细胞培养选用无酚红的 DMEM 培养基,排除了酚红的雌激素样作用对实验的干扰。另外,因血清中有微量雌激素,国外文献报道用碳吸附法除去血清中的类固醇激素^[4],本研究参考文献

[5],在实验开始时即应用 0.1% BSA 的无血清培养基,可排除血清中雌激素的影响。

骨钙素是骨组织的特异性蛋白,是骨组织中非胶原性蛋白的主要成分,是评价骨形成和骨转换率的特异性指标。本实验应用实时荧光定量 PCR 法及外标准曲线检测 MG 63 的骨钙素 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良好的量效关系,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 PCR 等方法。应用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^[6]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。

本研究结果显示,胰岛素、IGF-1、雌二醇各药物组内骨钙素基因的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增加趋势,其量效呈线性关系;3 药物组间骨钙素基因的 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,骨钙素 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^[7]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。

本研究参考国内外文献[8,9],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 1 ~ 100 nmol/L 不等^[10,7]。关于雌二醇的浓度,Cheng^[11]发现在 10^{-7} ~ 10^{-8} mol/L 浓度时,雌二醇对成骨细胞的作用最强,与本实验结果相符。纵

观近年来国内外在此领域的研究,用胰岛素作为成骨细胞的干预药物的报道甚少。笔者采用了胰岛素作为干预药物,首次在转录水平发现胰岛素有促进成骨样细胞分化的作用,证实了胰岛素这一来源方便、费用经济的生物性制剂和 IGF-1 与雌二醇一样均有促进细胞分化的作用,从而在实验和理论水平说明胰岛素类药物有保护糖尿病患者骨量的作用。

【参 考 文 献】

- [1] 俞文华,白秀英,李风平,等. 甲状旁腺素和胰岛素样生长因子促成骨样细胞 ROS1 增殖和分化中的协同作用. 中国生物化学与分子生物学报,2000,16:377-381.
- [2] Illard J, Umayahara Y, Wiren K. Regulated nuclear-cytoplasmic localization of CCAAT/enhancer-binding protein δ in osteoblasts. J Biol Chem,2001,276(18):15345-15361.
- [3] Tobisten S, Koburger T, Jurgen B, et al. Quantification of bacterial mRNA by one-step RT-PCR using the light cycler system. Biochemica,2003,3:43-45.
- [4] Gori F, Hofbauer LC, Cheryl A, et al. Effects of androgens on insulin like growth factor system in an androgen-responsive human osteoblastic cell line. Endocrinology,1999,140(12):5579-5586.
- [5] 李万根,庄万江,张彤. 染料木素对成骨肉瘤细胞株 SaOS₂ 增殖和分化功能的影响. 广州医学院学报,2000,28(3):7-9.
- [6] 张鋆. 荧光实时定量 PCR 技术初探. 生命科学趋势,2003,1(4):1-28.
- [7] 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.
- [8] Qutob S, Dixon SJ, Wilson JX. Insulin stimulates vitamin C recycling and ascorbate accumulation in osteoblastic cells. Endocrinology,1998,139(1):51-56.
- [9] Kim SJ, Chun JY, Kim MS. Insulin stimulates production of nitric oxide via ERK in osteoblast cells. Biochem Biophys Res Commun,2000,278(3):712-718.
- [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,2000,27(6):785-794.
- [11] Cheng MZ, Simon CF, Rawlinsine AA, 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(4):593-602.

(收稿日期:2006-11-17)