·论著·

1,25 双羟维生素 D_3 和染料木素对人成骨样 SaOS-2 细胞的作用

耿磊 陈文芳

中图分类号：R58；R363 文献标识码：A 文章编号：1006-7108(2008)04-0233-05

摘要：目的 研究 1,25 双羟维生素 D_3 [1,25-$(OH)_2D_3$]及染料木素(genistein)对人成骨样 SaOS-2 细胞的作用。**方法** 培养人成骨样 SaOS-2 细胞，经1,25-$(OH)_2D_3$、genistein 及二者联合应用后，用硝基苯磷酸二钠法(p-nitrophenylphosphate，pNPP)测定碱性磷酸酶(alkaline phosphatase，ALP)活性，逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测 ALP 及骨保护素(osteoprotegerin，OPG)mRNA 水平的变化。免疫印记法测定 OPG 蛋白表达。**结果** 1,25-$(OH)_2D_3$及 genistein 可显著提高 ALP 活性，但对 ALP mRNA 的表达没有影响。二者联合应用有协同作用，可显著提高 ALP 活性及 mRNA 的表达($P<0.01$)。1,25-$(OH)_2D_3$组可显著降低 OPG mRNA 及蛋白的表达，而与 genistein 共用时，此抑制作用消失($P<0.01$)。**结论** 1,25-$(OH)_2D_3$及 genistein 在促进人成骨样 SaOS-2 细胞的分化过程存在协同作用，genistein 通过调控 OPG 基因及蛋白的表达抑制1,25-$(OH)_2D_3$对破骨细胞的促进作用，从而促进骨的形成。

关键词：1,25 双羟维生素 D_3；染料木素；骨肉瘤细胞；碱性磷酸酶；骨保护素

The effects of 1,25-$(OH)_2D_3$ and genistein on human osteoblast-like SaOS-2 cells *GENG Lei*, *CHEN Wenfang*. *Department of Physiology*, *Medical College of Qingdao University*, *Qingdao* 266071, China

Abstract: Objective To investigate the effects of 1,25-$(OH)_2D_3$ and genistein on human osteoblast-like SaOS-2 cells. **Methods** SaOS-2 cells were cultured and treated with 1,25-$(OH)_2D_3$, genistein or both of 1,25-$(OH)_2D_3$ and genistein. The alkaline phosphatase (ALP) activity was determined by p-nitrophenylphosphate (pNPP). The gene expressions of ALP and osteoprotegerin (OPG) were detected by RT-PCR. The OPG protein expression was detected by Western blot. **Results** The ALP activity was significantly increased in 1,25-$(OH)_2D_3$ group and genistein group. Combined 1,25-$(OH)_2D_3$ and genistein treatment could further enhance the ALP activity and mRNA expression ($P<0.01$). 1,25-$(OH)_2D_3$ treatment could significantly decreased the OPG gene and protein expressions ($P<0.01$). These effects could be completely abolished by combined treatment with genistein. **Conclusion** 1,25-$(OH)_2D_3$ and genistein have synergistic effects on the differentiation of human osteoblast-like SaOS-2 cells. Genistein inhibits the osteoclastic bone resorption of 1,25-$(OH)_2D_3$ by regulating the OPG gene and protein expressions. Combined 1,25-$(OH)_2D_3$ and genistein treatment may have bone anabolic effects on human osteoblast-like SaOS-2 cells.

Key words: 1,25-$(OH)_2D_3$; Genistein; Osteosarcoma cell; Alkaline phosphatase; Osteoprotegerin

绝经后骨质疏松症是中老年妇女的常见病，其发病率远远高于男性，其主要原因是雌激素水平下降、维生素 D 缺乏和钙的摄入不足，导致骨的吸收大于骨的形成[1]。维生素 D 是骨代谢所必需的，经过肝脏和肾脏的转化，维生素 D 形成其生物代谢活性产物——1,25 双羟维生素 D_3 [1,25-$(OH)_2D_3$]。1,25-$(OH)_2D_3$可促进骨细胞的分化成熟[2]。雌激素主要是通过雌激素受体促进成骨细胞的活动，抑制破骨细胞的活动，从而达到阻止骨吸收，预防骨丢失，增加和维持骨密度的目的[3]。目前绝经后骨质疏松的治疗方法主要是应用药物刺激骨的形成，抑

基金项目：山东省教育厅资助项目(J05L01)

作者单位：266071 青岛，青岛大学医学院在读硕士，山东万杰医学高等专科学校(耿磊)；青岛大学医学院生理教研室(陈文芳)

通讯作者：陈文芳，Email：chenwenfangqd@yahoo.com.cn

制骨的吸收。特别是采用雌激素、钙剂或维生素D的联合使用比单制剂疗效更佳[4]。但研究资料显示雌激素替代治疗会增加乳腺癌、子宫内膜癌和中风等的发病率，雌激素替代治疗的副作用，限制了其在临床的广泛应用。因此应用天然的植物雌激素来替代雌激素疗法具有广阔的应用前景。

植物雌激素具有类雌激素样作用，可清除自由基和抗氧化应激。染料木素(genistein)是大豆异黄酮的主要活性成分，其化学结构和雌激素相似，是已知的植物雌激素。大量的流行病学资料、动物及离体细胞实验均已证实genistein可促进成骨细胞增殖和分化，增强骨密度，对骨质疏松具有一定的防治作用[5-7]。但1,25-$(OH)_2D_3$、genistein及二者联合应用对人成骨样SaOS-2细胞的作用，目前尚未见报道。本研究通过离体培养人成骨样SaOS-2细胞，模拟更年期的低雌激素水平，研究1,25-$(OH)_2D_3$、genistein及二者联合应用对SaOS-2细胞分化成熟的影响，以期为绝经后骨质疏松的防治提供进一步的实验依据。

1 材料和方法

1.1 试剂及其来源

SaOS-2细胞购自美国ATCC公司。DMEM培养基购自Invitrogen公司(美国)。染料木素、1,25-$(OH)_2D_3$及碱性磷酸酶检测试剂盒购自Sigma公司(美国)。逆转录试剂盒购自Promega公司(美国)。Tag DNA聚合酶购自TAKARA公司(日本)。骨保护素抗体购自Peprotech EC公司(英国)。

1.2 SaOS-2细胞的培养

SaOS-2细胞(ATCC No. HTB-85)接种于6孔或12孔板，用含10%胎牛血清和10 nmol·L^{-1}的地塞米松的DMEM培养基，于37℃、5% CO_2条件下培养。每3天换1次培养液，到第6天用含1%活性炭处理的胎牛血清(charcoal-stripped fetal bovine serum, sFBS)和10 nmol·L^{-1}的地塞米松的无酚红DMEM继续培养48 h后，应用genistein(1 μmol·L^{-1})或1,25-$(OH)_2D_3$(1 nmol·L^{-1})处理细胞24 h或48 h。二者联合应用组，先用1,25-$(OH)_2D_3$(1 nmol·L^{-1})预处理细胞24 h，再用genistein(1 μmol·L^{-1})处理细胞24 h或48 h。

1.3 ALP活性的测定

SaOS-2细胞应用genistein(1 μmol·L^{-1})或1,25-$(OH)_2D_3$(1 nmol·L^{-1})处理细胞48 h。二者联合应用组，先用1,25-$(OH)_2D_3$(1 nmol·L^{-1})预处理24 h，再用genistein(1 μmol·L^{-1})处理细胞48 h。用100 μL含有蛋白酶抑制剂(2 μg·mL^{-1} aprotinin，2 μg·mL^{-1} leupeptin，1 mmol·L^{-1} PMSF)的Nonidet P-40细胞裂解液裂解细胞，置冰中20 min后，以14000转/min的速度在4℃下离心30 min，上清液用于ALP活性的测定。取20 μL的上清液与ALP反应物混合，37℃孵育30 s，在波长405 nm读取吸光度作为INITIAL A，反应2 min时的吸光度作为FINAL A，ALP活性按下列公式计算：ALP(U/L) = [(FINAL − INITIAL)/2 × TV × 1000]/(18.45 × SV × LP)，其中TV是总体积(1.02 mL)，SV是样本体积(0.02 mL)，LP是光径(1 cm)。用Bradford法测定蛋白含量，以每μg蛋白中碱性磷酸酶活性单位表示。

1.4 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测ALP及OPG基因表达

SaOS-2细胞应用genistein(1 μmol·L^{-1})或1,25-$(OH)_2D_3$(1 nmol·L^{-1})处理细胞24 h。二者联合应用组，先用1,25-$(OH)_2D_3$(1 nmol·L^{-1})预处理24 h，再用genistein(1 μmol·L^{-1})处理细胞24 h。Trizol法从细胞中提取总RNA，取2 μg总RNA进行RT-PCR扩增。ALP上游引物：5′-GTGGACTATGCTCACAACAA-3′，下游引物：5′-GGAGAAATACGTTCGCTAGA-3′，扩增产物为597 bp；OPG上游引物：5′-GAACCCCAGAGCGAAATACA-3′，下游引物：5′-CGCTGTTTTCACAGAGGTCA-3′，扩增产物为441 bp；GAPDH上游引物：5′-ACCACAGTCCATGCCTACA-3′，GAPDH下游引物：5′-TTCACCACCCTGTTGCTGTA-3′，扩增产物为452 bp。将PCR产物在20 g·L^{-1}的琼脂糖凝胶上进行电脉，应用天能凝胶成像分析软件对条带进行半定量分析，检测ALP和OPG mRNA与其对应的内参GAPDH mRNA RT-PCR产物的光密度值，用二者PCR产物条带的光密度比值表示ALP和OPG基因的表达水平。

1.5 免疫印记实验

SaOS-2细胞接种于6孔板中，每孔细胞数量为5×10^5。应用1,25-$(OH)_2D_3$(1 nmol·L^{-1})预处理24 h，再用genistein(1 μmol·L^{-1})处理细胞24 h。收集条件培养基，应用Microcon-10浓缩，取上述样品20 μg在10% SDS-PAGE中电泳，分离蛋白质样本，后行Western印迹杂交转至硝酸纤维素膜上，用洗脱缓冲液(TTBS：20 mmol·L^{-1} Tris，500 mmol·L^{-1} NaCl，pH 7.4，0.05% Tween 20)配制的5%的脱脂奶进行封闭，加入OPG一抗(1∶1000)，反应1 h，用洗脱缓冲液

洗去一抗。再加入 1:2000 稀释的二抗，室温孵育 1 h，再与化学发光试剂 ECL 温浴 1 min，应用天能凝胶成像分析软件进行定量，以上过程重复 3 次。每次实验结束后，用考马氏亮蓝染膜，测定每个样本中所含的蛋白总量，以保证每个样本中的蛋白总量是相等的。

1.6 统计学处理

所有的实验重复 3 次或 4 次，实验结果采用均数 ± 标准差表示，应用 Prism 统计软件进行双因素方差分析(Two-Way ANOVA)继以 Tukey 法进行两两比较检验，$P < 0.05$，说明结果有统计学意义。

2 结果

2.1 1,25-$(OH)_2D_3$、genistein 及二者联合应用对 ALP 活性及 mRNA 表达的影响

与对照组相比，1,25-$(OH)_2D_3$ 组及 genistein 组 ALP 活性分别升高 19% 和 17%，差异显著($P < 0.05$)。但二者对 ALP mRNA 的表达均没有显著影响。应用 1,25-$(OH)_2D_3$ 预处理细胞后，再应用 genistein，ALP 活性及 mRNA 表达量较对照组分别升高 37% 和 29%，差异显著($P < 0.01$)(表 1，图 1)。

表 1 1,25-$(OH)_2D_3$、genistein 及二者联合应用对 ALP 活性的影响($n = 4, \bar{x} \pm s$)

组别	ALP($U \cdot L^{-1} \cdot \mu g^{-1}$)
对照组	2854 ± 108
1,25-$(OH)_2D_3$	3404 ± 200*
genistein	3359 ± 84*
1,25-$(OH)_2D_3$ + genistein	3927 ± 153**#

注：与对照组比较 * $P < 0.05$，** $P < 0.01$；1,25-$(OH)_2D_3$ + genistein 合用组与单用1,25-$(OH)_2D_3$组和 genistein 组比较 # $P < 0.05$

2.2 1,25-$(OH)_2D_3$、genistein 及二者联合应用对 OPG mRNA 及蛋白表达的影响

1,25-$(OH)_2D_3$ 抑制 OPG mRNA 及蛋白的表达，均较对照组降低约 35%($P < 0.01$)。genistein 组对 OPG mRNA 及蛋白的表达没有明显影响。应用 1,25-$(OH)_2D_3$ 预处理细胞后，再应用 genistein，OPG mRNA 及蛋白的表达与对照组相比，没有差异($P > 0.05$)(图 2,3)。

3 讨论

骨质疏松是最常见骨代谢疾病，其病因包括绝经后雌激素不足(Ⅰ型)及老年性阳光照射或维生素 D 摄入不足(Ⅱ型)。在防治绝经后女性骨质疏松中，雌激素、钙剂或维生素 D 的联合应用是治疗的

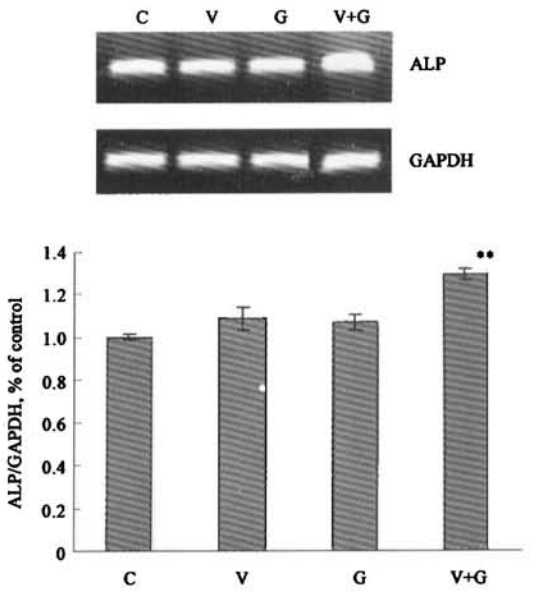

图 1 1,25-$(OH)_2D_3$、genistein 及二者联合应用对 ALP 活性及 mRNA 表达的影响

注：C：对照组；V：1,25-$(OH)_2D_3$ 组；G：genistein 组；V + G：1,25-$(OH)_2D_3$ + genistein 组。与对照组比较，** $P < 0.01$，$n = 3$

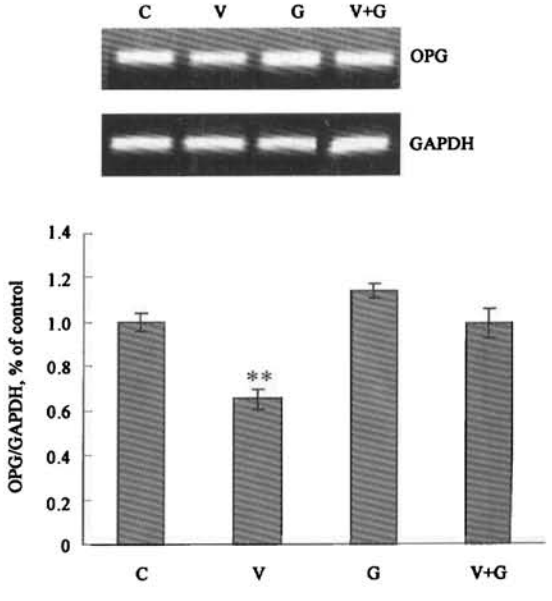

图 2 1,25-$(OH)_2D_3$、genistein 及二者联合应用对 OPG mRNA 的影响

注：C：对照组；V：1,25-$(OH)_2D_3$ 组；G：genistein 组；V + G：1,25-$(OH)_2D_3$ + genistein 组。与对照组比较，** $P < 0.01$，$n = 3$

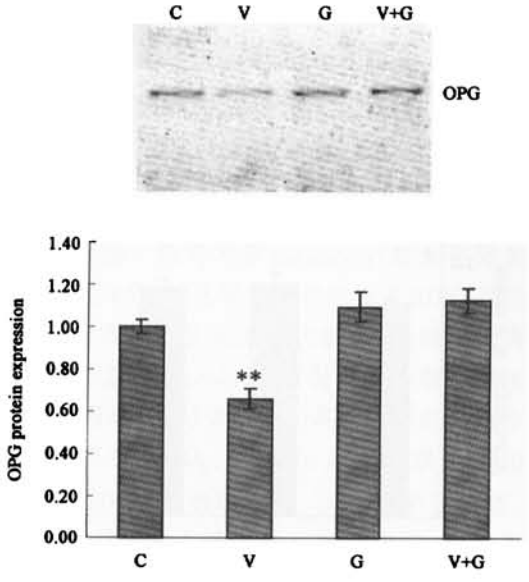

图 3 $1,25\text{-}(OH)_2D_3$、genistein 及二者联合应用对 OPG 蛋白表达的影响

注：C：对照组；V：$1,25\text{-}(OH)_2D_3$ 组；G：genistein 组；V + G：$1,25\text{-}(OH)_2D_3$ + genistein 组。与对照组比较，** $P < 0.01$，$n = 3$

首选。

研究显示，应用含 10 nmol·L^{-1} 地塞米松的培养基培养 SaOS-2 细胞，可促进细胞的分化，ALP 基础水平明显升高，$1,25\text{-}(OH)_2D_3$ 对此分化状态的细胞生物作用明显[8]。本研究也证实应用含 10 nmol·L^{-1} 地塞米松的培养基培养 SaOS-2 细胞，其 ALP 活性较无地塞米松培养基培养的细胞提高 1.9 倍，故本实验采用含 10 nmol·L^{-1} 地塞米松的培养基培养 SaOS-2 细胞，研究 $1,25\text{-}(OH)_2D_3$、genistein 及二者联合应用对其分化成熟的影响。

成骨细胞的增殖和分化受到甾体类激素如维生素 D 等的调节，$1,25\text{-}(OH)_2D_3$ 与其核受体（vitamin D receptor，VDR）结合形成复合物，能增强小肠黏膜上皮细胞对钙的吸收，对破骨细胞和成骨细胞均有刺激作用，既能促进骨的形成，又能刺激骨的吸收[9]。本研究结果显示 $1,25\text{-}(OH)_2D_3$ 通过提高 ALP 的活性，促进成骨细胞的分化成熟。$1,25\text{-}(OH)_2D_3$ 促进骨吸收可能是一种间接作用。大量研究揭示破骨细胞的分化成熟是受成骨细胞调节的。破骨前体细胞膜上存在有核因子 κB 受体活化子（receptor activator of nuclear factor-κB，RANK），各种刺激骨吸收的因子作用于成骨细胞使其分泌 RANK 的配体（receptor activator of nuclear factor-κB ligand，RANKL），二者结合后将信号转入破骨前体细胞，使破骨细胞分化成熟。同时成骨细胞可分泌一种骨保护素（osteoprotegerin，OPG），OPG 可竞争性的与 RANKL 结合，抑制破骨细胞的分化成熟[10]。本研究结果显示，$1,25\text{-}(OH)_2D_3$ 可显著降低 SaOS-2 细胞 OPG 基因和蛋白的表达，提示 $1,25\text{-}(OH)_2D_3$ 通过调节成骨细胞 OPG 基因和蛋白的表达，发挥其促进破骨细胞介导的骨吸收作用。

大量研究表明 genistein 可以与雌激素受体（estrogen receptor，ER）结合，发挥其类雌激素样作用。流行病学调查和动物实验揭示 genistein 和大豆苷原（daizin）可以缓解雌激素缺乏导致的骨的流失。本研究结果显示，genistein 可显著提高 SaOS-2 细胞 ALP 活性，对 OPG 基因及蛋白表达亦有弱的促进作用，但无统计学意义。目前，Rao 等[8,11] 对 $1,25\text{-}(OH)_2D_3$ 与雌激素对人成骨样 SaOS-2 细胞的协同作用进行了系列研究，结果显示，$1,25\text{-}(OH)_2D_3$ 可以显著提高 ALP 活性，此作用在雌激素存在的情况下会进一步增加。但 $1,25\text{-}(OH)_2D_3$ 与 genistein 对 SaOS-2 细胞的协同作用，尚未见报道。本研究应用 $1,25\text{-}(OH)_2D_3$ 预处理细胞后，genistein 可显著增加 ALP 活性，ALP 基因表达亦明显增加，提示二者联合应用后，可进一步促进 SaOS-2 细胞的分化。同时笔者也观察了 $1,25\text{-}(OH)_2D_3$ 预处理后，genistein 对 OPG 基因及蛋白表达的影响，结果显示，二者联合应用后，$1,25\text{-}(OH)_2D_3$ 对 OPG 基因和蛋白的抑制作用消失，其机制可能与 genistein 的类雌激素样作用有关。大量研究表明 SaOS-2 细胞表达 ERα 和 ERβ[12]，genistein 通过与 ER 结合，可以促进 OPG 基因和蛋白的表达[13]，虽然在本实验中，genistein 对 OPG 基因和蛋白表达的增加作用没有统计学意义，但抵消了 $1,25\text{-}(OH)_2D_3$ 对 OPG 基因和蛋白的抑制作用，提示 genistein 可能通过调控 OPG 基因及蛋白的表达，抑制 $1,25\text{-}(OH)_2D_3$ 对破骨细胞的促进作用，其他可能的作用机制有待于进一步探讨。

综上所述，$1,25\text{-}(OH)_2D_3$ 及 genistein 在促进人成骨样 SaOS-2 细胞的分化过程存在协同作用，二者联合应用能够刺激成骨细胞的分化，抑制破骨细胞的分化成熟，从而促进骨的形成，但其机制尚需进一步研究。

（下转第 269 页）

（上接第 236 页）

【 参 考 文 献 】

[1] Gaugris S, Heaney RP, Boonen S, et al. Vitamin D inadequacy among post-menopausal women: a systematic review. QJM, 2005, 98(9): 667-676.

[2] van Driel M, Pols HA, van Leeuwen JP. Osteoblast differentiation and control by vitamin D and vitamin D metabolites. Curr Pharm Des, 2004, 10(21): 2535-2555.

[3] Compston J. How to manage osteoporosis after the menopause. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2005, 19(6): 1007-1019.

[4] 张宏红,吴春维,何秀华. 雌激素加钙剂与钙剂对比治疗绝经后妇女骨质疏松症的骨密度测定分析. 贵州医药, 2001, 25(10): 904-905.

[5] Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, et al. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. Am J Clin Nutr, 2000, 72, 844-852.

[6] Chen X, Garner SC, Quarles LD, et al. Effects of genistein on expression of bone markers during MC3T3-E1 osteoblastic cell differentiation. J Nut Biochem, 2003, 14: 342-349.

[7] Hertrampf T, Gruca MJ, Seibel J, et al. The bone-protective effect of the phytoestrogen genistein is mediated via ER alpha-dependent mechanisms and strongly enhanced by physical activity. Bone, 2007, 40(6): 1529-1535.

[8] Rao LG, Liu LJ, Rawlins MR, et al. The biological activities of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D_3 and its synthetic analog 1alpha,25-dihydroxy-16-ene-vitamin D_3 in normal human osteoblastic cells and human osteosarcoma SaOS-2 cells are modulated by 17-beta estradiol and dependent on stage of differentiation. Biol Pharm Bull, 2001, 24(3): 242-248.

[9] Erben RG, Bromm S, Stangassinger M. Therapeutic efficacy of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D_3 and calcium in osteopenic ovariectomized rats: evidence for a direct anabolic effect of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D_3 on bone. Endocrinology, 1998, 139(10): 4319-4328.

[10] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell, 1997, 89(2): 309-319.

[11] Rao LG, Sutherland MK, Reddy GS, et al. Effects of 1alpha, 25-dihydroxy-16ene, 23yne-vitamin D_3 on osteoblastic function in human osteosarcoma SaOS-2 cells: differentiation-stage dependence and modulation by 17-beta estradiol. Bone, 1996, 19(6): 621-627.

[12] Miki Y, Suzuki T, Hatori M, et al. Effects of aromatase inhibitors on human osteoblast and osteoblast-like cells: a possible androgenic bone protective effects induced by exemestane. Bone, 2007, 40(4): 876-887.

[13] Chen WF, Wong MS. Genistein modulates the effects of parathyroid hormone in human osteoblastic SaOS-2 cells. Br J Nutr, 2006, 95: 1039-1047.

（收稿日期：2007-10-25）