

牛源乳铁蛋白对体外培养大鼠成骨细胞 RANKL 和 OPG mRNA 表达的影响

肖晖 刘宁

中图分类号: R151.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)07-0463-04

摘要:目的 观察牛源乳铁蛋白对成骨细胞核因子 $\kappa\beta$ 受体活化受体(RANKL)护骨素(OPG) mRNA 表达的影响。方法 体外分离培养新生大鼠成骨细胞,分别观察不同浓度乳铁蛋白处理不同时间对成骨细胞 RANKL/OPG mRNA 表达的影响。采用半定量 RT-PCR 方法检测 RANKL/OPG mRNA。结果 乳铁蛋白呈时间和剂量依赖性地刺激大鼠成骨细胞 OPG mRNA 的表达,而抑制 RANKL mRNA 的表达,使 RANKL/OPG 值降低。结论 乳铁蛋白通过调节成骨细胞 RANKL/OPG 的基因表达,从而抑制破骨细胞介导的骨吸收。

关键词:牛源乳铁蛋白;成骨细胞;核因子 $\kappa\beta$ 受体活化受体/护骨素

Effect of bovine Lactoferrin on the expression of RANKL and OPG mRNA in primary rat osteoblasts

XIAO Hui, LIU Ning. Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education; College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of Lactoferrin on the expression of RANKL and osteoprotegerin(OPG) mRNA in primary rat osteoblasts. **Methods** Primary osteoblastic cells were obtained from the calvarin of newborn Wister rats by digestion with 0.1% collagenase. The cells were treated with pamidronate according to the experimental design. Total cellular RNA was isolated with Trizol. Semiquantitative reverse transcription PCR method was used to determine the level of RANKL and OPG mRNA. **Results** The mRNA expression of OPG in osteoblasts was increased according to time and dose, while RANKL mRNA were decreased. **Conclusions** Lactoferrin stimulated production of OPG, while inhibiting the mRNA levels of RANKL in primary rat osteoblasts, which may, at least in part, be related to the inhibitory effects of bisphosphonates on the osteoclastic bone resorption.

Key words: Lactoferrin; Osteoblasts; RANKL/OPG

前言

乳铁蛋白(LF)是铁转运蛋白家族中的一种铁结合蛋白。存在于母乳、炎症高发区以及嗜中性粒细胞的次级颗粒中。在正常情况下,乳铁蛋白在体内的浓度为 $2 \sim 7 \times 10^{-6}$ g/ml。乳铁蛋白是一种具有抑菌、抗菌、抗病毒以及免疫功能的多效因子。近期,乳铁蛋白被发现具有促骨生长的功效^[1,2]。体内研究表明,乳铁蛋白能促进骨骼生长,在生理浓度下

能有效刺激成骨细胞增值和分化,抑制破骨细胞形成,在骨生长和代谢中起到一定的生理作用,但其作用机制未明。RANK、RANKL 和 OPG 是近年来发现的肿瘤坏死因子超家族的新成员,在调解骨吸收和骨形成方面起到关键作用^[3]。本实验通过观察乳铁蛋白对体外培养的大鼠成骨细胞 RANKL/OPG mRNA 的表达情况,进一步阐述乳铁蛋白促骨生长的机理。

1 材料和方法

1.1 实验动物

每次实验选用 Wister 乳鼠 6 只,雌雄各半,由哈尔滨医科大学肿瘤研究所提供。合格证号:scsk(黑 2006-008)。

基金项目:东北农业大学创新团队基金(200712001)

作者单位:150030 哈尔滨,东北农业大学食品学院乳品科学教育部重点实验室

通讯作者:刘宁,Email:ningliu6666@yahoo.com.cn

1.2 主要试剂

DMEM 培养液 (GIBCO), II 型胶原酶 (Sigma 公司), 胰蛋白酶 (Sigma), 胎牛血清 (TB2), 牛源乳铁蛋白 (WESTLAND 纯度 > 90%), TRIzol (Invitrogen), PCR 试剂盒 (Promega), 低分子量 Marker (DL2000)。

1.3 大鼠成骨细胞的培养

取新生 1 d 的健康 Wister 大鼠, 引颈处死, 75% 酒精浸泡 10 min, 取出置于消毒培养皿中。剪开头顶皮肤取出颅盖骨放入 PBS 中去除骨膜及周围结缔组织, 剪成 0.1 mm^3 大小的骨片块。在 0.25% 胰蛋白酶 37°C 下消化 20 ~ 30 min, 然后将骨片移入 II 型胶原酶中。 37°C 消化 90 ~ 120 min 后 1000 r/min 离心 5 min, 弃去消化液。加 DMEM 培养液反复吹打冲洗 3 次, 重复离心过程。加入 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养液制成细胞悬液, 调节细胞密度为 1×10^5 , 接种于培养瓶中, 置 37°C 、5% CO_2 及饱和湿度条件下培养。24 h 后换液, 以后每 2 ~ 3 d 换液 1 次, 待细胞铺满培养瓶时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 并传代培养。以差速沉降法纯化成骨细胞。

1.4 实验分组

取第三代细胞用 0.25% 胰酶消化后吹打均匀, 以 1.5×10^4 个/ cm^2 的密度终于培养瓶, 培养 24 h 后, 换为无血清 DMEM 培养液培养 24 h, 使细胞同步静止于 G_0 期, 然后按照实验设计剂量加入, (对照组和 LF 浓度分别为 0、10、50、100、200 和 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 6 个浓度组) 根据时间收集细胞。

1.5 细胞内总 RNA 的提取

用 4°C PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次, 每孔加入 1 ml Trizol, 按照说明书提取的步骤分别以氯仿、异丙醇和 75% 乙醇提取细胞内总 RNA。经紫外分光光度计测定 $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 的值, 各组比值均在 1.8 ~ 2.0。根据 $A_{260 \text{ nm}}$ 计算 RNA 的浓度, 以调整逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 总反应体系中各组 RNA 的加样量。

1.6 引物设计

根据 GenBank 并参照文献设计 RANKL、OPG 和 β -actin 3 对基因的引物, 由上海基康生物工程公司合成。

RANKL (385 bp) 上游: 5'-GCAGGAGAATGAAAC-AAGCC-3'; 下游: 5'-TTTAACGACATATACCATCAG-CTG-3'; OPG (333 bp) 上游: 5'-CCCTTGCCCTGACTA-CTCTTATAC-3'; 下游: 5'-GAATTAGCAGGAGGCCAA-GTG-3'; β -actin (292 bp) 上游: 5'-ACTCTTCCAGCC-TTCCTTCC-3'; 下游: 5'-CATACTCCTGCTTGCTGCTCC-

3。

1.7 逆转录及 PCR 扩增

按照试剂盒说明逆转录得 cDNA, 总 RNA 加样量为 1 μg 。PCR 反应条件: 预变性 95°C 3 min, 变性 94°C 30 s, 退火 58°C 30 s, 延伸 72°C 30 s, 共 30 个循环, 最后一个循环结束后 72°C 延伸 5 min, 产物经 1.7% 琼脂糖凝胶电泳, 用 UVP 凝胶成像系统进行观察, 用 Labworks 4.5 软件对阳性条带的密度进行分析。

1.8 统计学处理

所有实验重复 3 次以上, 以 β -actin 做内参照, 区带光密度比值以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 11.0 软件分析。两组间比较用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$, 差异有显著意义, $P < 0.001$ 差异极显著。

2 结果

分析电泳图, 可清晰看到 OPG 电泳中, 条带亮度随 LF 浓度增加而增强, 而 RANKL 条带亮度则呈减弱趋势。说明 LF 呈剂量依赖性刺激 OPG mRNA 的表达, 抑制 RANKL mRNA 的表达, 见图 1。

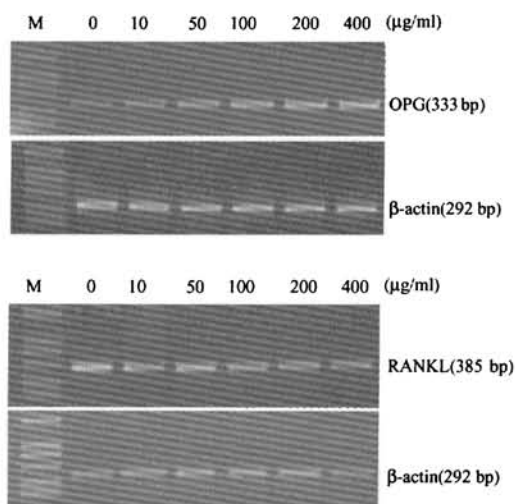


图 1 不同浓度的 LF 干预 24 h 对成骨细胞 RANKL/OPG mRNA 表达的影响

低分子量 Marker 条带从上至下依次为 2000、1000、750、500、250 和 100 bp。
0 代表对照组, 10 ~ 400 为乳铁蛋白浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

由图 2 可见, OPG mRNA 随浓度的增加而增加, 而 RANKL mRNA 则随浓度增加而降低。在对照组中, RANKL mRNA 较 OPG mRNA 表达活跃, 但随浓度增加二者逐渐发生变化, 在 LF 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

时,二者达到平衡,而后,随浓度增加,二者趋势逐渐明显,在 LF 浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,OPG mRNA 表达达到最高值。

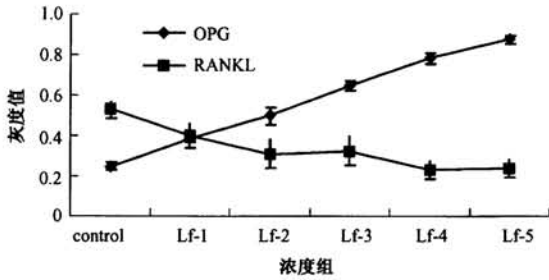


图2 不同浓度组作用于成骨细胞 24 h 其 OPG 与 RANKL 的表达趋势图

采用 Labwork 4.5 软件分析,获取条带灰度值进行分析。从浓度梯度上可以看出,用不同浓度(0、10、50、100、200 和 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的 LF 分别作用成骨细胞 24 h,呈浓度依赖型降低 RANKL/OPG mRNA 的表达,从 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LF 作用下 RANKL/OPG mRNA 表达即开始下降,5 个不同浓度组的 RANKL/OPG mRNA 表达较对照组差异均有显著性($P < 0.05$),其中 10、50、100 和 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 这 4 个浓度组较对照组相比差异极显著($P < 0.001$)。组间相比,200、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 两组间差异不显著,100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 较 50、200、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 3 组均差异显著($P < 0.05$),100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 较 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 差异极显著($P < 0.001$),见图 3。

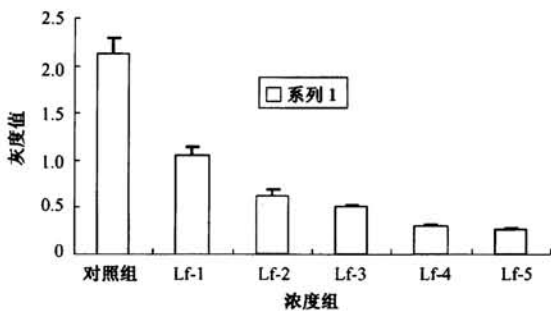


图3 不同浓度的 LF 干预 24 h 对成骨细胞 RANKL/OPG mRNA 灰度值柱状图

分析电泳图,可看出 OPG mRNA 在 24、48 和 72 h 时的条带亮度高于 24、48 和 72 h 时的条带亮度,说明浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 LF 呈时间依赖性刺激成骨细胞 OPG mRNA 表达,且高于单纯培养液培养成骨细胞时 OPG mRNA 表达;而 RANKL mRNA 则在 24、48 和 72 h 时的条带亮度低于 24、48 和 72 h 时的条带亮度,说明浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 LF 呈时间依赖性

抑制成骨细胞 RANKL mRNA 表达,见图 4。

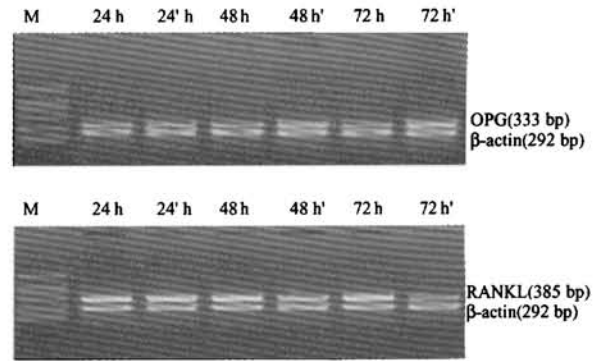


图4 对照组与 LF(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)在不同时间对成骨细胞 RANKL/OPG mRNA 表达的影响

低分子量 Marker 条带从上至下依次为 2000、1000、750、500、250 和 100 bp。

24 ~ 72 h 为对照组和 LF(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)干预时间。其中 24 h 对应对照组,24 h'对应 LF(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)组,以此类推

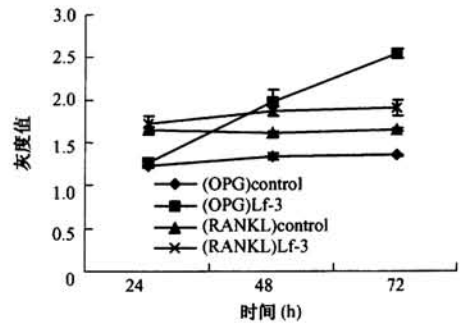


图5 LF-3 连续作用于成骨细胞 72 h OPG 和 RANKL 趋势图

由图 5 可见,在 24 h 时 LF-3 对成骨细胞中 OPG 与 RANKL mRNA 的表达不明显,与对照组相比,差异无显著性;48 h 时,OPG mRNA 较对照组相比,差异有显著性,72 h 时,OPG mRNA 表达达到最大值;而 RANKL mRNA 表达始终处于平稳状态,略有增高,但总体趋势不明显。

采用 Labwork 4.5 软件分析,获取条带灰度值进行分析。从时间梯度上可以看出,浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 LF 分别作用于成骨细胞 24、48 和 72 h, RANKL/OPG mRNA 表达均差异极显著($P < 0.001$)。而对照组在 24、48 和 72 h 的 RANKL/OPG mRNA 表达中,24 h 与 48 h 和 72 h 之间相比差异有显著性($P < 0.05$),但 48 h 和 72 h 之间差异无显著性,见图 6。

3 讨论

乳铁蛋白作为一种铁结合糖蛋白,以铁螯合的形态发挥其抗微生物活性、消炎、抗氧化以及铁代谢的功能。近期,Dorit 等^[1]将 LF 连续 5 天注射与成年

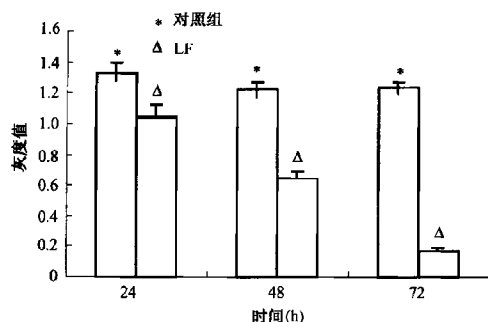


图 6 对照组与 LF(100 μ g/ml)连续作用 3 天
成骨细胞 RANKL/OPG mRNA 灰度值柱状图

雄鼠大脑右半球,采用荧光标记物皮下注射后 24 h 内处死大鼠,比较其颅骨片断得到,LF 组股表面间隙明显增加,矿物堆积率和骨形成率明显增加,推测 LF 可能增强成骨细胞作用而抑制了破骨细胞的作用。Takayama 等^[4]通过 LRP-1 受体证实乳铁蛋白能够强化胶原酶的沉积,从而增强骨密度。Cornish^[5,12]研究发现,乳铁蛋白能刺激成骨细胞形成周期,是成骨细胞的一种潜在生存因子,并且乳铁蛋白亦可降低破骨细胞数目,而抑制由破骨细胞引起的骨吸收。但是,乳铁蛋白如何影响成骨细胞的具体机制还不是十分清楚。

近年,在骨代谢方面取得的突破性进展是发现了以 RANKL/RANK/OPG 轴作为骨量的主要决定因素。RANKL(也称作 TRANCE、ODF 和 OPGL)是 I 型跨膜蛋白,并且是肿瘤坏死因子超家族的成员。OPG 属可溶性假受体,与 RANK 特异性竞争 RANKL。体内和体外实验均表明 OPG 能抑制骨的吸收^[6,7],而 OPG 的缺失则导致骨质疏松症^[8]。从本质上说,RANKL 和 OPG 的相对比率最终决定破骨细胞活性,因而影响骨吸收^[9,11]。

本实验通过体外培养大鼠成骨细胞,可观察到 LF 呈浓度和时间依赖性地促进成骨细胞 OPG mRNA 表达,而抑制 RANKL mRNA 表达,从而使 RANKL/OPG mRNA 比值降低。由此可以推断,LF 可能是通过 RANKL/RANK/OPG 轴抑制破骨细胞介导的骨吸收的机制。分析 RANKL 和 OPG 的相对比率,对充分了解 RANKL 和 OPG 的相互作用意义重大,因为 RANKL 和 OPG 的相对比率最终决定破骨细胞活性,因而影响骨吸收。采用 RT-PCR 法检测 RANKL/OPG mRNA 的结果显示,乳铁蛋白组与同时期对照组相比均能显著提高成骨细胞的 OPG 转录

水平,降低 RANKL 转录水平,提示了乳铁蛋白对成骨细胞的增殖与分化作用。本试验以细胞生物学为基础,从分子生物学角度讨论了乳铁蛋白对于成骨细胞的影响,为乳铁蛋白对骨质疏松症的治疗作用打下了一定的基础。

骨质疏松症已成为全球性的公共卫生问题之一,日益受到人们的广泛关注。骨形成和骨重建是一个生理学控制过程,该控制过程包括破骨细胞介导的骨吸收和成骨细胞介导的骨形成,本实验结果初步表明 LF 作用于成骨细胞可通过 RANKL/OPG mRNA 的表达发挥作用。但其作用机理有待进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] Dorit N, Andrew C. Lactoferrin-A Novel Bone Growth Factor. *Clinical Medicine & Research*, 2005, 3: 93-101.
- [2] Cornish J, Palmiano K, Callon KE, et al. Lactoferrin and bone: structure-activity relationships. *Biochem. Cell Biol*, 2006, 84: 297-302.
- [3] Magdalena C, Marlena CK. Osteoprotegerin-receptor activator of nuclear factor- κ B ligand ratio: a new approach to osteoporosis treatment. *Cancer Res*, 2000, 60(21): 6001-6007.
- [4] Takayama Y, Takezawa T. Lactoferrin promotes collagen gel contractile activity of fibroblasts mediated by lipoprotein receptors. *Biochem Cell Biol*, 2006, 84: 268-274.
- [5] Cornish J. Lactoferrin promotes bone growth. *BioMetals*, 2004, 17: 331-335.
- [6] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89: 309-319.
- [7] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. *Endocrinology*, 1998, 139: 1329-1337.
- [8] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*, 1998, 12: 1260-1268.
- [9] Chambers TJ. Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J Pathol*, 2000, 192: 4-13.
- [10] Feige U. Osteoprotegerin. *Ann Rheum Dis*, 2001, 60: 81-84.
- [11] Kostenuik PJ, Shalhoub V. Osteoprotegerin: a physiological and pharmacological inhibitor of bone resorption. *Curr Pharm Des*, 2001, 7: 613-635.
- [12] Cornish J. Lactoferrin promotes bone growth. *BioMetals*, 2004, 17: 331-335.

(收稿日期: 2008-02-19)