

脂联素通过 MAPK 途径诱导人成骨细胞分化的研究

张向梅 谢辉 袁凌青 罗湘杭 廖二元

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)07-0478-04

摘要:目的 本研究观察脂联素(adiponectin)对成骨细胞分化作用。方法 分化指标碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测,并观测 Adiponectin 对矿化的影响。细胞丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号转导阻断剂 U0126, SB203580 和 SP600125 干预,观察 Adiponectin 对成骨细胞分化作用的变化。p-JNK, JNK, p-p38, p38, p-ERK1/2, ERK1/2 用 Western Blot 检测。结果 Adiponectin 可提高 ALP 活性,并促进矿化结节形成。Adiponectin 作用于成骨细胞诱导 p38 和 JNK 磷酸化,而 p38 抑制剂 SB203580 可减轻 Adiponectin 对成骨细胞 ALP 活性的影响。结论 Adiponectin 通过 P38 信号转导途径诱导人成骨细胞分化。

关键词:脂联素;成骨细胞;增殖;细胞丝裂原活化蛋白激酶

Adiponectin stimulates human osteoblasts differentiation via the MAPK signaling pathway ZHANG Xiangmei, XIE Hui, YUAN Lingqing, et al. Department of Obstetrics & Gynecology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China

Abstract: **Objective** The present study was undertaken to investigate the action of adiponectin on osteoblast differentiation and its signal transduction. **Methods** ALP activity was measured by ELISA. It were investigated the changes at the action of adiponectin on osteoblast differentiation under the intervention of the signal transduction's blocker of MAPK (U0126, SB203580 and SP600125). p-JNK, JNK, p-p38, p38, p-ERK1/2 and ERK1/2 were analysed by Western Blot. **Results** Adiponectin promoted osteoblasts differentiation, resulting in a dose- and time-dependent increase in alkaline phosphatase (ALP) activity, and an increase in mineralized matrix. Adiponectin induces activation of p38 and JNK, but not ERK1/2 in osteoblasts. Furthermore, pretreatment of osteoblasts with the p38 inhibitor (SB203580), blocked the adiponectin-induced ALP activity. **Conclusion** These data indicate that adiponectin induces human osteoblast differentiation, and the differentiation response is mediated via p38 pathway. It suggests that osteoblasts be the direct targets of adiponectin.

Key words: Adiponectin; Osteoblast; Differentiation; Mitogen-activated protein kinase

脂联素(Adiponectin)是近期发现的脂肪细胞特异性分泌因子。成骨细胞上有 AdipoR 和 Adiponectin 的表达^[1-3],提示 Adiponectin 传达脂肪组织信号到骨组织,Adiponectin 参与骨代谢调节,具体机制不明。本研究观察 Adiponectin 对人成骨细胞(human osteoblasts, HOB)分化的作用。

1 材料和方法

作者单位: 410011 长沙,中南大学湘雅二医院妇产科(张向梅),代谢内分泌研究所(谢辉、袁凌青、罗湘杭、廖二元)

通讯作者: 廖二元, Email: liaoy2000@hotmail.com

1.1 细胞培养

临床标本由湘雅二医院提供。正常成人 HOB 培养方法参照文献[5]的方法进行。外科手术取正常成人(35~55岁)髂前上棘松质骨并剪成 2 mm³ 大小碎片, PBS 冲洗摇荡 3 次,加入 1 mg/ml IV 型胶原酶 37℃ 振摇消化,待松质骨变白并呈蜂窝状,加入含 20% 胎牛血清(FBS)的无酚红的 MEM 终止消化,含 10% FBS 的 MEM 洗涤 3 次,待洗液中不含细胞时,将骨片贴于 25 cm² 培养瓶壁,加含 15% FBS 的 MEM,其中含 50 μg/ml 抗坏血酸,青霉素 50 U/ml,庆大霉素 50 μg/ml, 37℃, 5% CO₂ 培养。2 d 后换液,以后每 3 天换液 1 次,培养约 15 d 后,可见有细胞游

出,约25 d后达汇片,用0.25%胰酶-EDTA(Sigma公司)消化液消化,再接种25 cm²培养瓶,细胞数为 5×10^5 个/瓶。

1.2 细胞干预试验

HOB培养于25 cm²培养瓶中,在含10%FBS的上述培养液中培养2 d,换1%FBS培养液培养4 d,含0.25%牛血清白蛋白(BSA, Sigma公司)的无血清MEM培养2 d,用0(含0.25%BSA的无血清MEM)、3、10、30 $\mu\text{g/ml}$ Adiponectin干预48 h,或用30 $\mu\text{g/ml}$ Adiponectin干预12~18 h。抽提细胞总蛋白用Bradford法测其含量、行免疫印迹。收集培养液行RIA。信号传导抑制剂U0126、SB203580、SP600125在Adiponectin干预前2 h加入。

1.3 ALP活性的测定

分别取在上述培养液培养HOB细胞,用PBS冲洗2次,细胞裂解液[50 mmol/L Tris-Cl (pH为8.0)、150 mmol/L NaCl、1% Triton X-100、0.02% NaN₃、1 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin、100 $\mu\text{g/ml}$ PMSF]加超声粉碎裂解细胞,离心后取上清液测定ALP活性。采用 α -磷酸奈酚法及全自动生化分析仪测定细胞内的碱性磷酸酶活性。用Bradford方法测出细胞内总蛋白含量,校正ALP。

1.4 矿化结节形成检测

HOB细胞用无酚红的MEM培养液培养于16孔板,其中含10%FBS、抗坏血酸100 $\mu\text{g/ml}$ 、青霉素50 U/ml、庆大霉素50 $\mu\text{g/ml}$,其中含10%FBS、抗坏血酸100 $\mu\text{g/ml}$ 、青霉素50 U/ml、庆大霉素50 $\mu\text{g/ml}$ 及10 mmol/L β -甘油磷酸酯,干预组加入30 $\mu\text{g/ml}$ adiponectin,连续培养16或22 d。用95%酒精固定,1%茜素红进行矿化结节染色。显微镜下及肉眼观察矿化结节并成像。

1.5 Western印迹杂交检测

取40 μg 细胞总蛋白或胞浆蛋白,检测p-JNK, JNK, p-p38, p38, p-ERK, ERK蛋白质在细胞内的表达。用含5%脱脂牛奶的PBS封闭过夜。电泳后转移至聚偏(二)氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上。封闭后用1 $\mu\text{g/ml}$ 的p-JNK, JNK, p-p38, p38, p-ERK, ERK抗体PBS温育1 h。1:1000抗兔、抗鼠辣根过氧化物酶的PBS温育1 h。化学发光增强试剂自显影1 min,洗片显带。所有杂交信号在BioRad-Jeldoc 2000图像分析系统进行光密度扫描,数值以各干预组与对照组的差值表示。

1.6 统计学处理

各实验独立重复3次以上,重复性好。所选图

表为重复实验的结果之一。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用多因素方差分析。

2 结果

2.1 Adiponectin促进HOB细胞分化

ELISA测定ALP活性,结果显示Adiponectin干预可增加ALP活性,此作用呈时间剂量依赖性(图1A,图1B)。茜素红染色矿化结节,结果显示Adiponectin干预可促进HOB矿化结节生成,与16 d相比,22 d矿化结节增多,颜色加深(图2、3)。

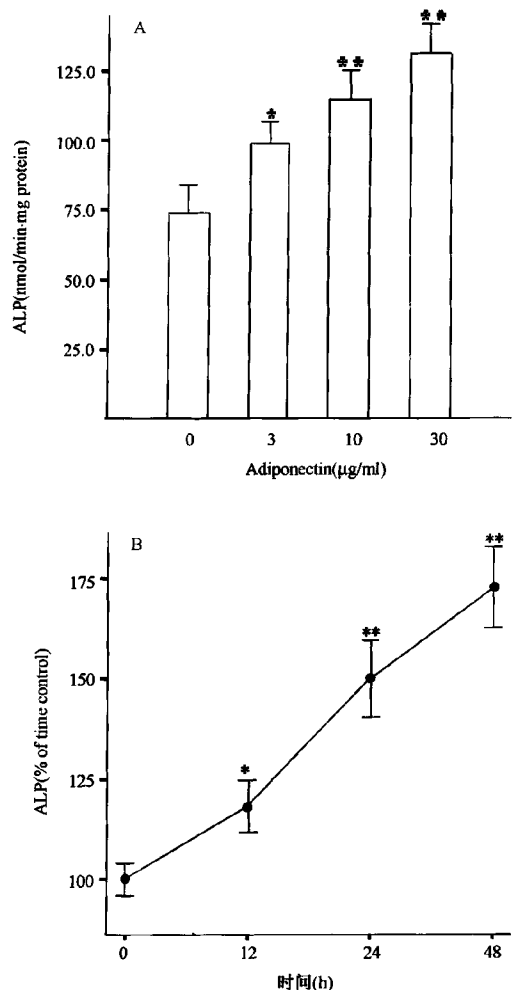


图1 Adiponectin干预对ALP活性影响

A 剂量关系图 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;

B 时间关系图 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 Adiponectin干预激活p38和JNK激酶

MAPK在细胞增殖分化调节中起重要作用^[6],本研究检测Adiponectin干预HOB对MAPK激酶的

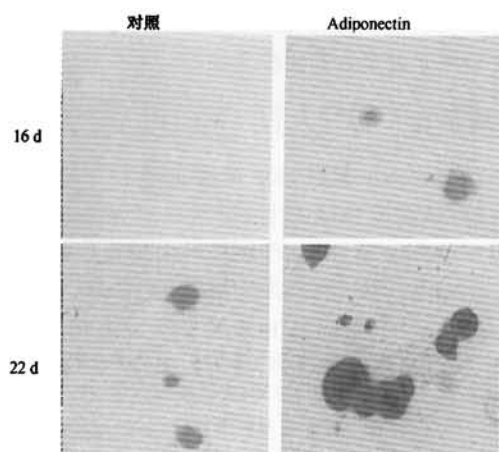


图 2 Adiponectin 干预对矿化结节生成的影响 ($\times 200$)

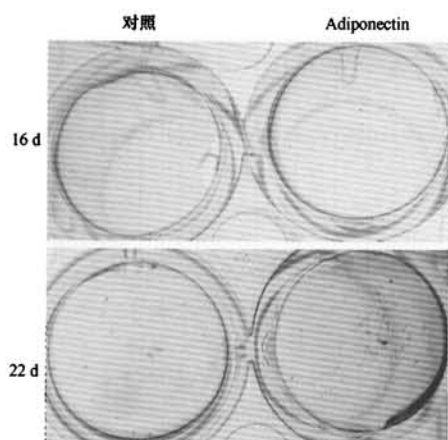


图 3 Adiponectin 干预对矿化结节生成的影响 (整体观)

影响。Western 印迹杂交检测 MAPK 的激活, Adiponectin 干预后 30 min, 可检测到 p38 和 JNK 磷酸化, 而 ERK 无磷酸化 p-ERK 表达 (图 4A)。p38 信号传导抑制剂 SB203580 和 JNK 信号传导抑制剂 SP600125 可阻断 Adiponectin 促 p38 和 JNK 磷酸化作用 (图 4B)。

2.3 p38 参与 Adiponectin 促分化的调节

用 ELISA 测定 ALP 活性观察信号传导抑制剂 U0126、SB203580、SP600125 对 Adiponectin 促分化的调节作用, 结果显示 p38 抑制剂 SB203580 可取消 Adiponectin 促分化效应 (图 5)。

3 讨论

脂联素是近期发现的脂肪细胞特异性分泌因子^[1]。近期的研究在成骨细胞有 AdipoR 的表达^[3],

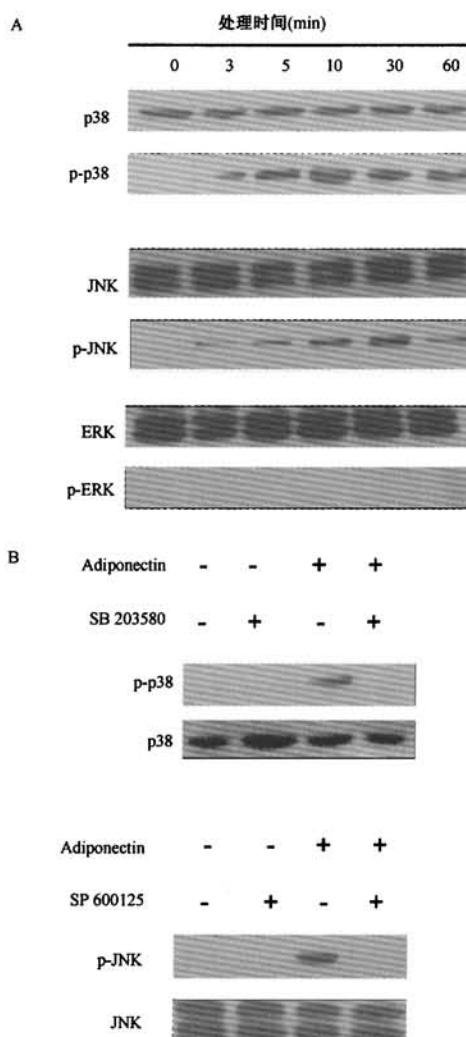


图 4 Adiponectin 调节 MAPK 激酶的激活及信号阻断剂和 RNA 干扰对其作用的影响

但 Adiponectin 对成骨细胞的作用尚未明确。本研究显示, Adiponectin 可促进 HOB 分化, 而 p38 激酶参与细胞分化的调节。

AdipoR 具有不同亚型: AdipoR₁ 和 AdipoR₂, Adiponectin 通过受体的介导可激活腺苷酸激酶 (AMP kinase)、MAPK 和过氧化物酶体增生物激活受体 (PPAR) α 配体, 并促进脂肪酸氧化及葡萄糖摄取^[4]。有研究表明成骨细胞有 AdipoR₁ 和 AdipoR₂ 表达^[3]。综上所述, Adiponectin 与成骨细胞 AdipoR 结合而产生生物效应。

本研究发现 Adiponectin 可促进 HOB 细胞分化, 可上调 ALP 的活性, 此作用呈时间剂量依赖性。成

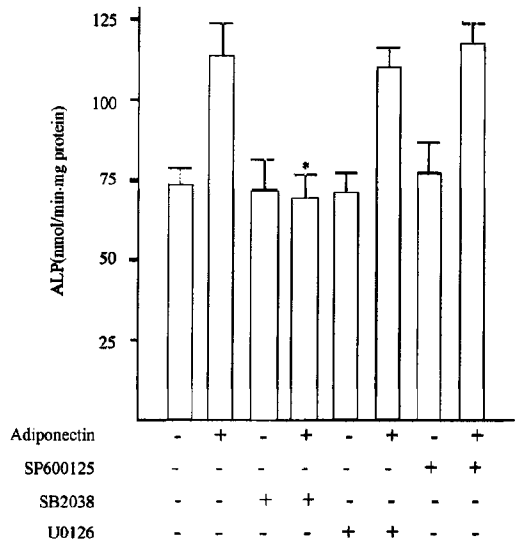


图 5 AdipoR1 及 p38 参与 Adiponectin 促分化的调节

骨细胞标志性表型是矿化结节的形成^[7]。ALP 是参与矿化结节形成的重要酶和基质蛋白,本研究亦发现 Adiponectin 可促进 HOB 矿化结节形成。

为进一步了解 Adiponectin 促进 HOB 分化的机制,本研究观察 Adiponectin 作用的信号转导。MAPK 在细胞增殖分化调节中起重要作用^[6]。有研究表明 Adiponectin 与 AdipoR₁ 交互作用激活 MAPK 激酶^[3, 8, 9]。本研究结果显示 Adiponectin 作用于成骨细胞,诱导 p38 和 JNK 激活,对 ERK1/2 激活无作用。p38 信号传导抑制剂 SB203580 可阻断 Adiponectin 促 p38 磷酸化作用。用 p38 抑制剂 SB203580 预处理成骨细胞可取消 Adiponectin 促分化作用,而 JNK 和 ERK 抑制剂无此作用,提示 p38 介导了 Adiponectin 促分化作用。

新近的研究提示 adiponectin 是参与骨代谢调节的因子之一。Lenchik 等^[10]发现 Adiponectin 是影响骨密度(BMD)和内脏脂肪分布的又一新的因素,血清 Adiponectin 与 BMD 呈互相关。Adiponectin 与骨代谢的关系尚不清楚。目前的研究表明 Adiponectin

促进成骨细胞分化。

总之,本研究证实成骨细胞是 Adiponectin 直接作用靶点之一,Adiponectin 通过 p38 信号转导途径诱导人成骨细胞分化。Adiponectin 是参与骨代谢调节的因子之一。

【参 考 文 献】

[1] Stewart KJ, Deregis RJ, Turner KL, et al. Fitness, fatness and activity as predictors of bone mineral density in older persons. J Intern Med, 2002, 252: 381-388.

[2] Hla MM, Davis JW, Ross PD, et al. Early postmenopausal intervention cohort (EPIC) study group, a multicenter study of the influence of fat and lean mass on bone mineral content: evidence for differences in their relative influence at major fracture sites. Am J Clin Nutr, 1996, 64: 354-360.

[3] Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, et al. Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. Bone, 2004, 35: 842-849.

[4] Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. Nature, 2003, 423: 762-769.

[5] Liao EY, Luo XH. Effects of 17beta-estradiol on the expression of matrix metalloproteinase-1, -2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human osteoblast-like cell cultures. Endocrine, 2001, 15: 291-295.

[6] Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. FASEB J, 1995, 9: 726-735.

[7] Yang S, Wei D, Wang D, et al. In vitro and in vivo synergistic interactions between the Runx2/Cbfa1 transcription factor and bone morphogenetic protein-2 in stimulating osteoblast differentiation. J Bone Miner Res, 2003, 18: 705-715.

[8] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. Circulation, 2002, 105: 2893-2898.

[9] Shibata R, Ouchi N, Ito M, et al. Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. Nat Med, 2004, 10: 1384-1389.

[10] Lenchik L, Register TC, Hsu FC, et al. Adiponectin as a novel determinant of bone mineral density and visceral fat. Bone, 2003, 33: 646-651.

(收稿日期: 2008-02-28)