

瘦素对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 增殖及 OPG/RANKL mRNA 表达的影响

刘爱茹 董进

中图分类号: R361⁺.3 文献标识码: B 文章编号: 1006-7108(2008)08-0552-04

摘要:目的 初步探讨瘦素对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 细胞增殖及骨保护蛋白、核因子 κ B 激活受体配体 mRNA 表达的影响。方法 以小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 为体外实验模型,用 MTT 法检测瘦素作用 MC3T3-E1 细胞后的增殖情况,RT-PCR 方法检测 OPG、RANKL mRNA 表达。结果 瘦素(10、20、40、80 和 160 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)作用于 MC3T3-E1 细胞 24 h 后,可促进其增殖,OD 值显著增加($P < 0.01$),增加骨保护蛋白 mRNA 表达,同时降低核因子 κ B 激活受体配体 mRNA 表达,且呈浓度依赖性。结论 瘦素促进 MC3T3-E1 细胞增殖,同时通过调节骨保护蛋白 mRNA 和核因子 κ B 激活受体配体 mRNA 的表达,从而促进骨形成,抑制骨吸收。

关键词: 瘦素; 瘦素受体; 成骨细胞; 破骨细胞; 骨保护蛋白; 核因子 κ B 激活受体配体

Leptin effect on the proliferation and OPG/RANKL mRNA expression in MC3T3-E1 osteoblasts of mice

LIU Airu, DONG Jin. Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: **Objective** To study the effect of leptin on proliferation and the expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) mRNA in MC3T3-E1 osteoblasts of mice. **Methods** The osteoblasts MC3T3-E1 were cultured *in vitro*, the effects of different levels of leptin on osteoblast proliferation were assessed by MTT colorimetry; the expression OPG and RANKL mRNA in MC3T3-E1 was analyzed by semi-quantitative RT-PCR. **Results** Proliferation of MC3T3-E1 was promoted by leptin(10, 20, 40, 80, 160 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) after 24 hour. Semi-quantitative RT-PCR examination revealed: leptin promote OPG mRNA expression and inhibit the RANKL mRNA expression, in concentration-dependent manner. **Conclusion** Leptin promotes proliferation in MC3T3-E1 osteoblasts of mice, and promotes OPG mRNA expression and inhibits RANKL mRNA expression, accordingly promotes bone formation, and inhibits bone resorption.

Key words: Leptin; Leptin receptor; Osteoblast; Osteoclasts; OPG; RANKL

瘦素(Leptin)是由肥胖基因编码、167 个氨基酸组成,主要由白色脂肪组织分泌的蛋白质类激素,分子量为 16kU。研究发现,瘦素参与骨代谢,并介导了骨量、脂量和生殖三者之间的关系,在骨代谢中发挥重要的调节作用^[1],然而瘦素在骨重建中的作用是非常复杂且充满争议的。体外研究表明,瘦素能促进成骨细胞增殖分化,抑制其凋亡,促进成骨细胞合成细胞外基质蛋白、多种生长因子和细胞因子^[2]。近来研究还发现^[3],瘦素可通过 OPG/RANKL/RANK 系统,参与调节破骨细胞的生成,从

而影响骨重塑过程。

OPG/RANKL/RANK 系统是近年来发现的破骨细胞分化过程中的一个重要信号传导通路,是成骨细胞作用于破骨细胞的重要途径^[4]。研究证实,骨保护素(osteoprotegerin,OPG)是一种分泌型糖蛋白,可以抑制破骨细胞的产生和活性。核因子 κ B 受体活化因子配基(receptor activator of NF- κ B Ligand, RANKL)是一种 II 型跨膜蛋白,是目前发现的唯一具有诱导破骨细胞分化、发育、发挥功能的因子;OPG 是 RANKL 的可溶性阻断受体。OPG/RANKL 比值大,抑制破骨细胞分化;反之,促进破骨细胞分化。破骨细胞分化因子(receptor activator of NF- κ B, RANK)是一种 I 型跨膜蛋白,是 RANKL 的唯一受体,是 RANKL 发挥功能的关键;OPG-RANKL-RANK

作者单位: 030001 太原,山西医科大学第一附属医院内分泌科

通讯作者: 刘爱茹, Email: liuairuvvv@163.com

骨调节轴,是影响破骨细胞分化、发育、调节其功能惟一的、最终的途径,不仅在多种骨质疏松的发病中起重要作用,而且也为骨质疏松的治疗开辟了广阔的前景。本实验通过研究不同浓度瘦素对成骨细胞增殖及 RANKL、OPG mRNA 表达的影响,探讨瘦素在骨代谢平衡 OPG/RANKL/RANK 系统中发挥的作用,深入研究骨质疏松症发病机制,为防治人类骨质疏松症等骨代谢疾病提供新途径。

1 材料和方法

1.1 实验材料

瘦素(购于美晶生物制剂公司),小鼠 MC3T3-E1 细胞株(购于浙江大学医学部),DMEM 培养基(GIBCO),胎牛血清(购于四季青生物制剂公司),胰蛋白酶,EDTA,D-Hank's 液,二甲基亚砜,碘化丙啶及 MTT(均购于美国 Sigma 公司);寡核苷酸引物,TRIzolRNA 提取试剂盒,dNTP,M-MLV 逆转录酶,PCR marker(fermentas),DNA 聚合酶,引物,Beta 引物(上海生工),分光光度计(U-2001,HITACHI,日本),PCR 热循环仪(Gene Amp 9600,PE 公司,美国),垂直电泳槽(Bio-Rad 公司,美国),电泳仪(Bio-Rad Power/PAC 200,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 小鼠 MC3T3-E1 细胞复苏后,将细胞以 1×10^6 /mL 接种于培养瓶中以 DMEM(DMEM 粉 13.3 g,NaHCO₃ 0.8 g,HEPES 3.5 g,青霉素 0.05 g,链霉素 0.05 g)加 10% 胎牛血清为培养液,在 37℃,5% CO₂ 浓度,饱和湿度下培养,24 h 换液,以后 2~3 d 更换 1 次培养液。

1.2.2 瘦素对成骨细胞增殖影响的测定(MTT 法):调整细胞密度为 1×10^5 ,接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,24 h 后换含不同浓度瘦素(0、10、20、40、80、160 ng·mL⁻¹)的 DMEM 培养液,每组设 6 个重复孔,孵育 24 h。于细胞培养终止前每孔加入 MTT(5 g·L⁻¹) 40 μ L,继续孵育 4 h。吸弃孔内上清液,每孔加入 DMSO 150 μ L,振荡 10 min,在 490 nm 波长处检测各孔吸光度(OD 值)。

1.2.3 瘦素对成骨细胞 OPG、RANKL mRNA 表达的影响:将细胞接以 1×10^3 密度种于培养瓶中,在 37℃,5% CO₂ 浓度,饱和湿度下培养 24 h,后换含不同浓度瘦素(0、10、20、40、80、160 ng·mL⁻¹)的 DMEM 培养液,24 h 后,应用 Trizol 提取细胞总 RNA 后,用

RT-PCR 方法测 OPG、RANKL mRNA 表达。细胞总 RNA 提取和 PCR 步骤如下。

(1)cDNA 第一链合成:采用(TAKARA RNA-PCRKit(AMV) Ver 3.0)试剂盒,10 μ L 反应体系,样本 RNA 5 μ L,随即引物 91 μ L,DEPC-水 6 μ L 离心混匀,70℃,5 min 后置于冰上,加入 5× buffer 4 μ L, RNA inhibitor 1 μ L, dNTP 2 μ L 离心混匀,25℃,5 min,再加反转录酶 1 μ L,按下面条件进行:25℃,10 min,42℃,60 min,72℃,10 min。

(2)PCR 步骤:PCR 扩增 OPG 和 RANKL,同时扩增 Beta 作为内参。引物序列如下:OPG 上游引物:5'-cacagtggaggaggaagacatt-3',下游引物:5'-gagaagaacccatctggacat-3',PCR 产物为 291 bp。RANKL 上游引物:5'-gacgttaagcaacggaaaactaa-3',下游引物:5'-gctaattgttcacgaaatgagtc-3',PCR 产物为 381 bp。Beta 上游引物:5'-ctacaatgagctgcgtgtggc-3',下游:5'-caggtccagacgcaggatggc-3',PCR 产物为 270 bp。反应体系共 25 μ L,PCR 反应液配置如下:H₂O 13.5 μ L,10× buffer 2.5 μ L,10 mmol·L⁻¹ dNTP 0.5 μ L,primer1(25 μ mol·L⁻¹) 0.25 μ L,primer2(25 μ mol·L⁻¹) 0.25 μ L,Taq 酶 1 μ L,25 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 2 μ L,cDNA 5 μ L。反应条件:94℃变性 20 s,54℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,36 次循环。

(3)PCR 产物鉴定与分析:取 PCR 扩增产物 10 μ L 和 6X 加样缓冲液 2 μ L 点样于 15 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶,80 V 电压下电泳,于紫外线箱中观察并照像记录。产物鉴定以 PCR marker 为标准。通过 Alpha Imager 2200 型凝胶成像分析仪对目的基因和参照基因条带进行像素值测定,并算出二者比值。

1.2.4 统计学处理:应用 SPSS 11.0 统计学软件对实验数据进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 差异有显著性。

2 结果

2.1 瘦素对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

不同浓度的瘦素(0、10、20、40、80、160 ng·mL⁻¹)作用于 MC3T3-E1 细胞,培养 24 h 后,显微镜下观察成骨细胞,MTT 比色法测定培养液 OD 值。结果表明,随着瘦素浓度增高,显微镜下观察成骨细胞数目显著增加,各组 OD 值显著增高,且呈浓度依赖性,对照组与实验组,实验组组间比较,统计学差异均有显著性($P < 0.01$),见表 1。

表 1 不同 Leptin 浓度培养 24 h 时对 MC3T3-E1 细胞增殖(OD 值)的影响

浓度 (ng·mL ⁻¹)		OD 值					(x ± s)
0	0.688	0.691	0.712	0.702	0.697	0.708	0.6963 ± 0.0158
10	0.825	0.813	0.802	0.836	0.817	0.813	0.8177 ± 0.0117
20	0.851	0.849	0.861	0.858	0.865	0.847	0.8552 ± 0.0072
40	0.870	0.869	0.875	0.878	0.888	0.868	0.8747 ± 0.0076
80	0.894	0.907	0.897	0.898	0.910	0.907	0.9022 ± 0.0067
160	0.994	0.985	0.976	0.969	0.989	0.979	0.9820 ± 0.0091

注:对照组与实验组比较, $P < 0.05$;实验组组间比较, $P < 0.05$

2.2 Leptin 对 MC3T3-E1 细胞 OPG、RANKL mRNA 表达的影响

用不同浓度瘦素(0、10、20、40、80、160 ng·mL⁻¹)培养 MC3T3-E1 细胞 24 h,通过半定量 RT-PCR 检测 MC3T3-E1 细胞 OPG 和 RANKL mRNA 的表达。结果表明,随着瘦素浓度的增加,可使 MC3T3-E1 细胞表

面 OPG mRNA 表达升高,光密度比值明显增加;而 RANKL mRNA 表达降低,光密度比值明显减低,且呈剂量依赖性变化,见图 1。对照组与 10 ng·mL⁻¹相比($P > 0.05$),无统计学差异。其余浓度对照组与实验组、实验组组间比较,均具有统计学差异($P < 0.05$),见表 2。

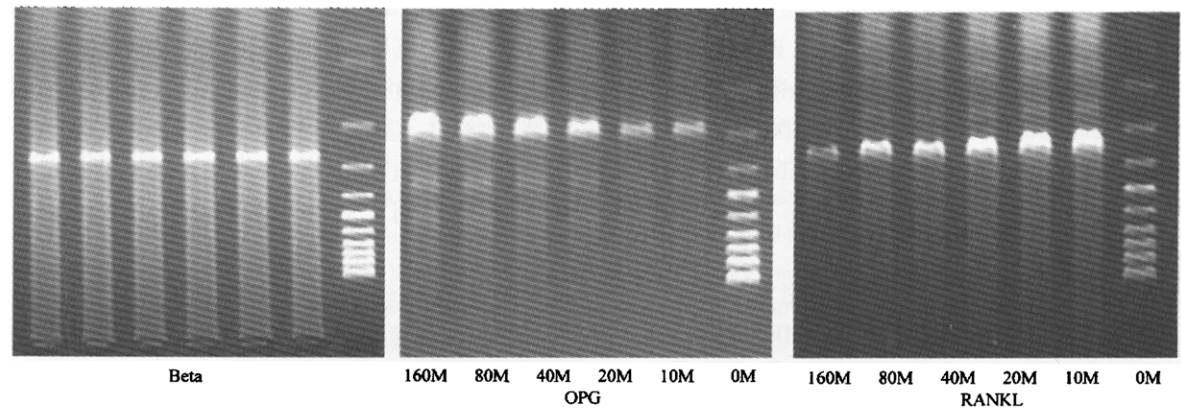


图 1 RT-PCR 检测瘦素对 MC3T3-E1 细胞 OPG、RANKL mRNA 表达的影响

表 2 不同 Leptin 浓度培养 24 h 时 MC3T3-E1 细胞 OPG、RANKL 的灰度值

浓度 (ng·mL ⁻¹)	OPG 灰度值	RANKL 灰度值
0	0.3864 ± 0.02565	0.8229 ± 0.06465
10	0.4043 ± 0.02937*	0.8059 ± 0.05715*
20	0.6722 ± 0.05245**	0.7238 ± 0.05245**
40	0.8141 ± 0.05238**	0.5668 ± 0.04162**
80	0.09161 ± 0.06142**	0.4535 ± 0.04029**
160	1.0203 ± 0.04508**	0.2422 ± 0.01652**

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与对照组比较, ** $P < 0.05$;实验组组间比较, $P < 0.05$

3 讨论

3.1 Leptin 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

1999 年,Thomas 等发现,在用瘦素处理后,人骨

髓基质干细胞 hMS2-12 细胞向成骨细胞方向分化增加,向脂肪细胞方向分化降低,导致培养中细胞外基质的矿化增加。Reseland 等^[5]首次证实了瘦素及其受体在原代培养的正常人类成骨细胞(hOBs)上的表达,且该受体的激活可能与成骨细胞的生存、生长、增殖与骨矿化有关。Iwamoto 等^[6]用定量 RT-PCR 的方法证实,在人成骨细胞表面表达有瘦素长型受体,且发现瘦素与这些受体结合,还可以促进成骨细胞的增殖。这与 Gordeladze 等^[7]的发现一致。Lamghari 等^[8]证实了 MC3T3-E1 细胞上瘦素功能型受体的表达。瘦素与成骨细胞上的瘦素受体结合,促进成骨细胞生长、增殖、分化与矿化,抑制其凋亡,从而刺激成骨,促进骨形成。

本实验以不同浓度瘦素作用于 MC3T3-E1 细胞,经过 24 h 培养,镜下观察成骨细胞数目显著增

加,不同浓度实验组组间比较,随着瘦素浓度增高,MTT 比色法测定培养液 OD 值呈显著增加趋势。这表明瘦素作用于成骨细胞,通过与其表面瘦素受体结合后,促进成骨细胞增殖,从而促进骨形成。且在本实验使用的浓度下($0 \sim 160 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$),促进成骨细胞增殖呈浓度依赖性增加,这与国内外的相关报道相一致。

3.2 Leptin 对 MC3T3-E1 细胞 OPG、RANKL mRNA 表达的影响

近来还有研究揭示,瘦素可参与调节破骨细胞的生成,从而影响骨重塑过程。破骨细胞表面无瘦素受体表达,而一些研究发现,瘦素有抑制破骨细胞生成的作用。Holloway 等^[9]发现,在人外周血单核细胞中,瘦素可促进 OPG 的蛋白和 mRNA 表达,同时降低 RANK 的表达。Burguera 等^[10]发现瘦素不仅可抑制人间质细胞分泌 RANKL,还可促进人间质细胞合成分泌 OPG。RANKL 与 RANK 结合,可促进破骨细胞生成,而 OPG 是 RANKL 的诱饵受体,可阻碍 RANKL 与 RANK 的结合。而 OPG/RANKL/RANK 系统是近年来发现的破骨细胞分化过程中的一个重要信号传导通路,是成骨细胞作用于破骨细胞的重要途径。可见瘦素与成骨细胞表面的瘦素受体特异性结合,可通过促进 OPG 表达,降低 RANKL 表达,促进 RANKL 与诱导物受体 OPG 的结合,从而使 OPG/RANKL 比值增大,抑制破骨细胞的生成^[10],抑制骨吸收。

本实验以不同浓度瘦素作用于 MC3T3-E1 细胞,经过 24 h 培养,用 RT-PCR 方法测 OPG、RANKL mRNA 表达。实验结果表明,随着瘦素浓度增高,可使 OPG mRNA 表达升高,而 RANKL mRNA 表达降低,对照组与 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 实验组相比,虽然表达在数值上增加(或降低)了,但是没有统计学意义,考虑可能由于这两组浓度接近,故 RT-PCR 方法,没有检测出其差别。而其余实验组与对照组,实验组组间比较,均具有统计学意义,且呈浓度依赖性表达增加或降低,这与 Lamghari 等^[8]所做的,不同浓度瘦素作用于 MC3T3-E1 细胞后,RANKL mRNA 表达降低的结果相一致。可见瘦素可通过促进 OPG 表达,降低 RANKL 表达,从而抑制破骨细胞的生成^[10]。从这些研究结果可以看出,瘦素可通过影响 RANKL/RANK/OPG 系统的平衡,即促进 OPG 表达、降低 RANKL 表

达,使 OPG/RANKL 比值大,从而抑制破骨细胞分化,达到抑制破骨细胞的生成,抑制骨吸收的作用。

骨代谢的稳定依赖于骨吸收与骨形成之间的动态平衡。瘦素作为参与骨代谢的重要调节因子,在中枢具有抑制骨形成作用,同时在外周可直接与成骨细胞上的瘦素受体特异结合,以内分泌、自分泌和旁分泌形式通过受体后信号转导调节成骨细胞功能,同时还影响了其他几种调节骨代谢激素,如 IGF-1、糖皮质激素、生长激素等的水平,共同参与调节骨重建和骨生长。在体内瘦素的中枢性和外周性作用哪种占主导?且瘦素与成骨细胞作用后,是否还存在其他作用途径参与调节骨重建呢?这些问题目前还存在很大的争议,有待于我们去研究与探索。

【参 考 文 献】

- [1] Patricia D, Thorsten S, Gerard K. The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, 2000, 289: 1501-1504.
- [2] Jan O, Gordeladze, Janne ER, et al. Pharmacological interference with transcriptional control of osteoblasts: A possible role for leptin and fatty acids in maintaining bone strength and bone lean mass. *Curr Pharm Des* 2001; 7: 275-290.
- [3] Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, et al. Leptin inhibits osteoclast generation. *Bone Miner Res* 2002; 17: 200-209.
- [4] Magdalena C, Marlena CK. Osteoprotegerin-receptor activator of nuclear factor- κ B ligand ratio: a new approach to osteoporosis treatment? *Southern Medical Journal*, 2004, 97(5): 506-511.
- [5] Reseland JE, Syversen U, Bakke I, et al. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *Bone Miner Res* 2001; 16: 1426-1433.
- [6] Iwamoto I, Fujino T, Douchi T. The leptin receptor in human osteoblasts and the direct effect of leptin on bone metabolism. *Gynecol Endocrinol* 2004; 19: 97-104.
- [7] Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, et al. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling. *Cell Biochem* 2002; 85: 825-836.
- [8] Lamghari M, Tavares L, Cambao N, et al. Leptin effect on RANKL and OPG expression in MC3T3-E1 osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry* 2006; 98: 1123-1129.
- [9] Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, et al. Leptin inhibits osteoclast generation. *Bone Miner Res* 2002; 17: 200-209.
- [10] Burguera B, Hofbauer L, Thomas T, et al. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology*, 2001, 142: 3546-3553.

(收稿日期:2008-03-18)