

T3 对 MG63 细胞株增殖及 TRAIL, OPG, OPGL 表达的影响

周玮 王加林 杜云翔 王建国 陈金拳

中图分类号: R581.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)06-0423-05

摘要:目的 观察在不同浓度三碘甲状腺原氨酸环境下人成骨肉瘤 MG63 细胞株增殖和肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)及其护骨素(OPG)、护骨素配体(OPGL)的表达,探讨甲亢性骨质疏松症的发病机制。方法 用不同浓度 T3 (0 、 1.0×10^{-12} 、 1.0×10^{-10} 、 1.0×10^{-8} mol/L) 分别刺激培养的 MG63 细胞 24 h, MTT 比色分析法测定细胞增殖,流式细胞仪检测细胞周期,逆转录 PCR(RT-PCR)法检测基因表达情况,免疫细胞化学法检测 MG63 细胞中 TRAIL 的表达及分布。结果 T3 以浓度依赖方式抑制 MG63 细胞的增殖,并将细胞阻滞于 G_1 期。T3 能下调 MG63 细胞中 OPG 的表达,上调 OPGL 和 TRAIL 的表达。TRAIL 免疫反应阳性物质密度高浓度 T3 组明显高于对照组。结论 T3 可抑制成骨细胞的增殖,导致成骨细胞中 TRAIL 和 OPGL 表达增多,OPG 的表达减少。这可能是甲亢性骨质疏松症的重要发病机制之一。

关键词: 三碘甲状腺原氨酸; MG63 细胞; 护骨素; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体

doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.06.007

Effects of different concentration of T3 on the proliferation and expressions of TRAIL, OPG, OPGL in MG63 cells ZHOU Wei, WANG Jialin, DU Yunxiang, et al. Department of Endocrinology, the PLA 82 Hospital, Huai'an 223001, China

Abstract: **Objective** To observe the regulative effects of different concentration of T3 on the proliferation and expressions of osteoprotegerin (OPG), the ligand of osteoprotegerin (OPGL) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in osteosarcoma MG63 cells, and to study the role of non-physiological concentration of T3 in pathogenesis of hyperthyroidism osteoporosis. **Methods** The osteoblast proliferation was measured by antigenic MTT colorimetric analysis. The cell cycle of the cells was determined by flow cytometry. The expressions of OPG, OPGL and TRAIL mRNA were examined by reverse transcriptase (RT)-PCR, expression and distribution of TRAIL in MG63 cells was investigated by immunohistochemical method. **Results** T3 could restrain the proliferation of MG63 cells in a dose-dependent manner and could arrest the cell cycle at G_1 phase. High concentration of T3 up-regulated the expressions of OPGL and TRAIL but down-regulated OPG expression in the MG63 cells, and the intensity of immunostaining for TRAIL in high concentration of T3 group was stronger than that in control group. **Conclusion** One of the key pathogenetic factors of hyperthyroidism osteoporosis is that high concentration T3 restrains the proliferation of MG63 cells and leads to the decreasing expression of OPG but the increasing expressions of some bone-resorbing cytokines such as OPGL and TRAIL in osteoblasts, then stimulates osteoclast differentiation and activity, which potentiates bone resorption and bone loss.

Key words: Triiodothyronine; MG63 cells; Osteoprotegerin; Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

甲状腺功能亢进症(简称甲亢)是临床上常见的自身免疫性疾病,易并发骨质疏松,且为高转换率型

骨质疏松,许多激素、细胞因子参与了其发病过程^[1]。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是新发现的肿瘤坏死因子超家族成员,可表达于人体的许多组织,对一些肿瘤细胞具有很强的杀伤作

作者单位: 223001 江苏省淮安市,解放军第 82 医院内分泌科

通讯作者: 周玮, Email: xiaowei_82yy@126.com

用^[2,3],还在一些自身免疫性疾病的发病中起作用^[4,5]。但是否参与甲亢时的高甲状腺激素血症所引起的骨质疏松,目前少见报道。护骨素(osteoprotegerin,OPG)是 TRAIL 的一个特殊的可溶性受体,且与护骨素配体(osteoprotegerin ligand,OPGL)同为肿瘤坏死因子家族的成员,在调节破骨细胞的形成和活化方面起重要作用^[6],这些细胞因子之间形成复杂的调控网络,成为许多骨代谢调节激素(因子)在骨细胞水平发挥调节作用的共同通道。我们观察不同浓度三碘甲状腺原氨酸(Triiodothyronine,T3)对具有人成骨细胞表型特征的 MG63 细胞株增殖和 TRAIL 及其 OPG,OPGL 的基因表达情况,拟从成骨细胞的角度进一步探讨甲亢性骨质疏松症的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料

第 106 代 MG63 细胞株由中南大学湘雅二医院代谢内分泌研究所惠赠;MEM 培养液购自 Sigma 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所;牛血清白蛋白购自 Gibco 公司;Trizol 试剂盒购自 Gibco 公司;逆转录反应试剂盒购自 Promega 公司;PCR 扩增试剂盒和 DNA 梯度 Marker 购自 TaKaRa 公司;引物由北京三博远志公司合成。鼠抗人 TRAIL 单克隆抗体购自第四军医大学免疫学教研室;生物素标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自宝泰克公司;ABC 复合物购自华美生物工程公司;DAB 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

细胞培养及干预试验:第 106 代 MG63 细胞株,根据实验要求接种于培养瓶或培养板(Nunc 公司)

中,用含 10%胎牛血清、50 mg/L 维生素 C 的无酚红 MEM 培养液,于 37℃,5%CO₂ 条件下培养,3 d 换液 1 次。细胞达 50%~60% 汇片后换含 0.1% 牛血清白蛋白的无血清 MEM 培养液培养 3 h 后,加入不同浓度的 T3,使其终浓度分别为 0、1.0×10⁻¹²、1.0×10⁻¹⁰、1.0×10⁻⁸ mol/L。

1.2.1 MG63 细胞增殖测定

1.2.1.1 MTT 比色分析法:接种在 96 孔培养板的细胞 T3 干预 24 h 后,吸去上清液,每孔加入 1 mg/mL MTT 100 μL,于 37℃孵育 2 h,细胞内出现深蓝色晶体后,终止培养,吸弃孔内上清液,每孔加入 100 μL DMSO,4℃冰箱内过夜,使细胞内结晶体完全溶解,直接于 DG3022 酶联免疫检测仪 570 nm 波长处比色,测定 OD 值。

1.2.1.2 流式细胞仪细胞周期检测:不同浓度 T3 的 MEM 培养液培养 24 h 后,消化收集细胞约 10⁶,PBS 洗涤两次后快速加入 4℃ 1 mL 预冷的流式细胞固定液(含 70% 无水酒精,1.5% 牛血清,28.5% PBS),吹打混匀制成细胞悬液。加入 PI 染液 4℃ 染色 30 min。FCM 测定细胞 DNA 含量,专用软件进行细胞周期和凋亡分析。

1.2.2 半定量 RT-PCR:Trizol(Gibico 公司)抽提细胞总 RNA。取 2 μg 总 RNA,用逆转录试剂盒合成 cDNA,再取 1 μL cDNA 行 PCR 扩增 OPG,OPGL,TRAIL 基因,以 β-actin 基因为内对照,引物序列及扩增条件见表 1。10 μL PCR 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,拍照,并用 Imagemaster VDS 凝胶图像分析系统行条带光密度检测,测值与 β-actin 光密度值比较,比值表示各 mRNA 的表达量。

表 1 表 1 各基因引物序列及扩增条件

基因	引物序列 (5'-3')	退火温度 (℃)	Mg ²⁺ 浓度 (mM)	循环次数	产物长度 (bp)
TRAIL	正向 GGCAATTCATTCCTGAGCAACTT	57	20	30	908
	反向 GATCTCGTGATCTACCCACCTT				
OPG	正向 AGTGGGAGCAGAAGACATTG	55	20	30	268
	反向 ATTGGACCTGGTTACCTATC				
OPGL	正向 GCGTCGCCCTGTCTTCTAT	55	20	30	598
	反向 TTGGTGCTTCCTCCTTTCAT				
β-actin	正向 CGTGGGCCGCCCTAGGCACCA	55	20	30	243
	反向 TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG				

1.2.3 免疫细胞化学 ①细胞爬片经 40 g/L 甲醛固定后,经二甲苯、无水乙醇常规脱水。②用 5 mL/L 甲醇-双氧水室温作用 30 min,以封闭内源性过氧化物酶。③滴加鼠抗人 TRAIL 单克隆抗体(稀释度为 1:200)于 4℃ 过夜。④加生物素标记的羊抗鼠 IgG 抗体(稀释度为 1:100)室温孵育 2 h。以上各步骤之间均用 0.01 mL/L PBS (pH 7.3)振洗 5 min × 4 次。⑤加 ABC 复合物(稀释度为 1:200)室温孵育 1 h。⑥DAB (含 DAB 5.0 mg,0.01 mL/L PBS 40 mL 和 300 mL/L 双氧水 40 μL)显色 10~20 min。⑦脱水、透明及 DPX 封片。⑧结果观察及记录。采用 OLYMPUS BH-2 光学显微镜观察并摄片。以正常羊血清及 PBS 代替一抗染色,作为阴性和空白对照。

1.3 统计学处理

用 SPSS 13.0 软件包统计分析。方差齐性数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD-*t* 检验, $P \leq 0.05$ 认为有显著性统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 T3 对 MG63 细胞增殖及细胞周期的影响

MTT 比色结果显示,T3 以浓度依赖方式抑制 MG63 细胞的增殖,与对照组相比, 1.0×10^{-10} mol/L 组即可明显抑制 MG63 细胞的增殖 ($P < 0.05$),并在 1.0×10^{-8} mol/L 组达到最大效应 ($P < 0.05$)。T3 也以浓度依赖方式影响细胞周期,高浓度 T3 可明显将

细胞阻滞在 G₁ 期(见表 2)。

表 2 不同浓度 T3 对 MG63 细胞增殖及细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	MTT(OD 值)	G ₁ 期细胞 (%)	S 期细胞 (%)
对照组	0.2700 ± 0.0155	37.66	12.31
1.0×10^{-12} mol/L 组	0.2589 ± 0.0160	57.45	16.60
1.0×10^{-10} mol/L 组	0.2288 ± 0.0156 ^{ab}	64.74	8.95
1.0×10^{-8} mol/L 组	0.2037 ± 0.0183 ^{abc}	74.66	8.28

注 与对照组比较,^a $P < 0.05$ 与 1.0×10^{-12} mol/L 组比较,^b $P < 0.05$ 与 1.0×10^{-10} mol/L 组比较,^c $P < 0.05$

2.2 T3 对 MG63 细胞 TRAIL,OPG 和 OPGL mRNA 表达的影响

RT-PCR 半定量结果显示,T3 能上调 MG63 细胞中 TRAIL mRNA 的表达。 1.0×10^{-10} mol/L 即可出现上调作用,并在 1.0×10^{-8} mol/L 时这种上调作用更明显。另一方面,相同浓度的 T3 能上调 MG63 细胞中 OPGL mRNA 的表达,按照对照组、 1.0×10^{-12} mol/L 组、 1.0×10^{-10} mol/L 组、 1.0×10^{-8} mol/L 组顺序递增 (P 均 < 0.05), 1.0×10^{-8} mol/L 组的 OPGL mRNA 表达明显高于对照组 ;同时 T3 能下调 MG63 细胞中 OPG mRNA 的表达,与对照组和 1.0×10^{-12} mol/L 组相比, 1.0×10^{-10} mol/L 即可降低 OPG mRNA 表达,并在 1.0×10^{-8} mol/L 时这种下调作用更明显(见表 3,图 1)。

表 3 不同浓度 T3 对 MG63 细胞 TRAIL,OPG 及 OPGL mRNA 表达的影响($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	TRAIL	OPG	OPGL	OPG/OPGL
对照组	0.736 ± 0.016	0.966 ± 0.023	0.105 ± 0.012	9.264 ± 0.891
1.0×10^{-12} mol/L	0.781 ± 0.023	0.956 ± 0.011	0.135 ± 0.009 ^a	7.107 ± 0.441 ^a
1.0×10^{-10} mol/L	0.890 ± 0.025 ^{ab}	0.915 ± 0.019 ^{ab}	0.201 ± 0.022 ^{ab}	4.585 ± 0.417 ^{ab}
1.0×10^{-8} mol/L	1.011 ± 0.064 ^{abc}	0.907 ± 0.014 ^{ab}	0.234 ± 0.020 ^{abc}	3.902 ± 0.277 ^{ab}

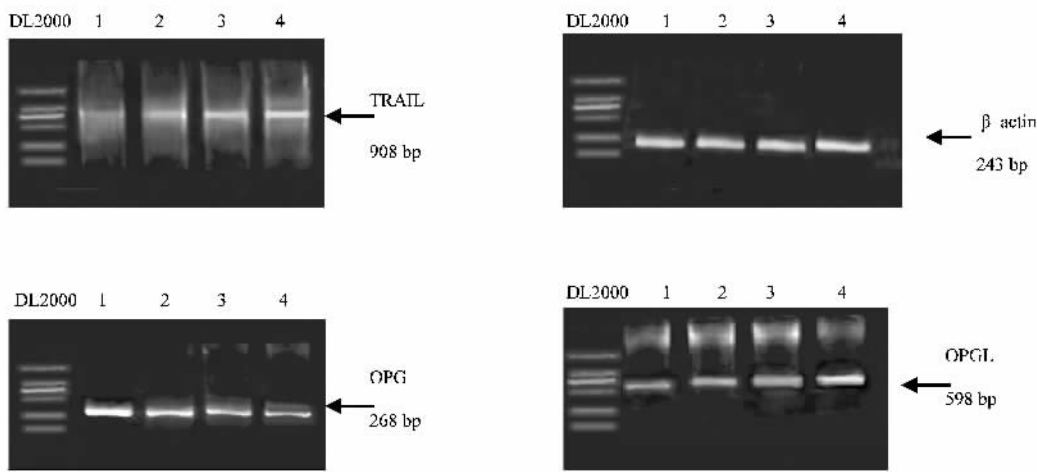
注 与对照组比较,^a $P < 0.05$ 与 10^{-12} mol/L 组比较,^b $P < 0.05$ 与 10^{-8} mol/L 组比较,^c $P < 0.05$

2.3 T3 对 MG63 细胞 TRAIL 免疫组织化学染色的影响

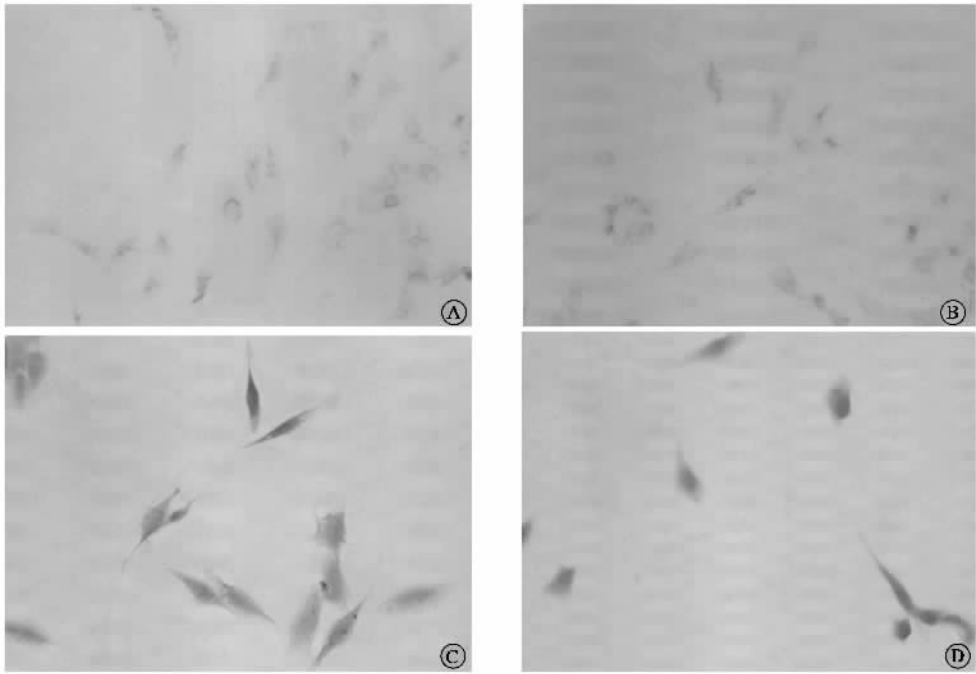
TRAIL 免疫反应阳性细胞多呈梭形,少数呈不规则形。阳性物质呈棕黄色颗粒,位于胞质内,胞核阴性。在对照组及 1.0×10^{-12} mol/L 组中,TRAIL 免疫反应产物呈阴性或弱阳性。在 1.0×10^{-10} 及 1.0×10^{-8} mol/L 组中,胞质中 TRAIL 免疫反应阳性物质密度明显增高(图 2)。

3 讨论

甲亢时甲状腺激素分泌增多,甲状腺激素以三碘甲状腺原氨酸(T₃)的形式与成骨细胞核和细胞膜的甲状腺素受体(TR)结合而控制成骨细胞的复制和蛋白的合成。甲亢对骨代谢的影响主要表现为骨吸收与骨形成均增强,并以前者增强为主,呈现高转



1 对照组 2 10^{-12} mol/L 组 3 10^{-10} mol/L 组 4 10^{-8} mol/L 组
图 1 不同浓度 T3 对 MG63 细胞 TRAIL, OPG 及 OPGLmRNA 表达的影响



A 对照组 B 1.0×10^{-12} mol/L 组 C 1.0×10^{-10} mol/L 组 D 1.0×10^{-8} mol/L 组
图 2 不同浓度 T3 对 MG63 细胞 TRAIL 免疫反应产物的影响 (SABC $\times 200$)

换型的特点,从而引起骨矿物质含量减少和骨质疏松。

TRAIL 是一种能与多种受体结合,发挥诱导或抗凋亡作用的细胞因子。TRAIL 有 5 个受体:死亡受体(DR4, DR5)、诱骗受体(DcR1, DcR2)和分泌型受体 OPG。TRAIL 与 DR4, DR5 相互作用,诱导许多组织来源的肿瘤细胞株迅速凋亡,但不能诱导正常细胞凋亡。TRAIL 的两个诱骗受体 DcR1 缺乏死亡功能区, DcR2 只含有死亡功能区的 1/3,因而不能介导凋亡,但是可以抑制 DR4、DR5 介导的凋亡^[7]。OPG 是一个分泌型的 TNF 受体,是骨代谢的一个重

要的负调控因子,能抑制破骨细胞(OC)生成、活化,减少骨吸收^[6,8,9],增加骨密度的作用。它主要通过中性结合 OPGL 发挥骨保护作用,后者是诱导 OC 生成的关键性细胞因子,通过作用于 OC 上的受体 RANK,刺激 OC 形成、分化及活化,增强骨吸收。OPG 竞争性结合 OPGL,阻断 OPGL 与其靶信号受体 RANK 的结合,抑制 OPGL/RANK 对破骨细胞信号转导的活化,减少 OC 生成,发挥抗骨质疏松作用。许多研究资料表明,甲状腺激素对 OC 的许多调节作用是通过改变 OB 的功能状态间接实现的,而 OPG/OPGL 系统是甲状腺激素调节 OC 生成和抗骨吸收

的作用途径之一。OPG 还能通过与 TRAIL 的竞争性结合,抑制 TRAIL 和死亡受体结合,来抑制 TRAIL 诱导细胞凋亡的作用。反之,TRAIL 可结合 OPG,并相互中和对方的功能^[8],即可间接解除 OPG 对 OPGL 的结合,抑制它的抑制破骨细胞的发生和增加骨密度的作用。可见 OPG 和 TRAIL 是相互抑制的。

我们用 MTT 比色分析法观察了不同浓度 T3 对具有成骨细胞表型特征的 MG63 细胞增殖的影响,发现 T3 能显著降低 MG63 细胞的增殖能力,呈一定的量效关系。细胞周期中 G₁ 期为 DNA 和蛋白质合成的准备阶段,DNA 复制和组蛋白的合成在 S 期完成,本实验流式细胞仪细胞周期检测结果也表明,T3 可改变细胞周期,把细胞阻滞于 G₁ 期。这些均提示了 T3 可以明显损害成骨细胞的增殖,这可能是甲亢性骨质疏松症的发病机制之一。

我们从基因水平观察了不同浓度 T3 对 MG63 细胞株中 OPG,OPGL 表达的影响。发现 T3 能使 OPGLmRNA 表达增加,呈剂量依赖性,T3 浓度越高,OPGL mRNA 的表达越高。T3 同时能抑制 MG63 细胞中 OPG mRNA 的表达,使细胞内 OPG/OPGL 比率降低。提示 T3 对成骨细胞中 OPG/OPGL 水平的调节,可能是甲亢导致骨质疏松症的机制之一,T3 引起 OPG/OPGL 比率失调,导致骨质疏松。

我们还观察了不同浓度 T3 对 MG63 细胞株 TRAIL 基因和蛋白表达的影响。发现随着 T3 浓度的升高,TRAIL 表达增多。TRAIL 是与细胞凋亡有关的细胞因子,这提示了高浓度的 T3 可能是通过 TRAIL 以自分泌或旁分泌的形式介导成骨细胞(OB)的凋亡,从而调节 OB 的数量,导致骨形成减少,骨质疏松的发生。另一方面,T3 环境下 TRAIL 表达的增多,可竞争性结合 OPG,阻断后者对 OPGL 的结合,促进了 OC 数目的增多及分化成熟,导致骨质疏松。关于 TRAIL 的死亡受体和诱骗受体在甲亢性

骨质疏松症发病中的变化情况,有待于进一步的研究。

由此我们推测,甲亢患者体内高甲状腺激素血症可能会抑制成骨细胞的增殖能力,TRAIL 与其分泌型受体 OPG 及 OPGL 可能参与了甲亢性骨质疏松症的发病过程,临床上积极抗甲状腺治疗有助于预防骨质疏松症的发生。

【参 考 文 献】

- [1] 史铁繁,王旭,吴从愿.协和内分泌和代谢学.北京:科学出版社,2000:1517-1519.
- [2] Morrison B, Tang Z, Jacobs B, et al. Apo2L/TRAIL induction and nuclear translocation of inositol hexakisphosphate kinase 2 during IFN- β -induced apoptosis in ovarian carcinoma. *Biochem J*, 2005,385 (Pt 2):595-603.
- [3] 成诗银,张惠中,陈剑秋,等.肿瘤细胞内特异表达 TRAIL 载体的构建及其在喉癌细胞株 Hepa2 中的表达.第四军医大学学报,2005,26(12):1108-1111.
- [4] 付建芳,姬秋和,黄威权,等.桥本甲状腺炎中 TRAIL 及其死亡受体 DR4,DR5 的表达.第四军医大学学报,2002,23(10):920-923.
- [5] 史治宙,姬秋和,宋朝军,等.Graves 病患者血清可溶性 TRAIL 水平升高.中华内分泌代谢杂志,2006,22(1):55-56.
- [6] Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*, 2000,15:2-12.
- [7] Sanlioglu AD, Dirice E, Aydin C, et al. Surface TRAIL decoy receptor-4 expression is correlated with TRAIL resistance in MCF7 breast cancer cells. *BMC Cancer*, 2005,5:54.
- [8] Pritzker LB, Scatena M, Giachelli CM. The Role of Osteoprotegerin and Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand in Human Microvascular Endothelial Cell Survival. *Mol Biol cell*, 2004, 15(6):2834-2841.
- [9] Norman HB. RANK ligand and the regulation of skeletal remodeling. *J Clin Invest*, 2003,111(8):1120-1122.

(收稿日期:2009-04-27)