

# 瘦素对人成骨样细胞 MG63 I 型胶原 A1 基因表达的影响

彭绵 陈澍 蔡晓华 彭晓容 彭逸潮

中图分类号: R329.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)10-0732-05

**摘要:**目的 探讨瘦素对人成骨样细胞 MG63 I 型胶原 A1 基因表达的影响。方法 MG63 细胞以 3 个不同浓度的瘦素( $10^{-8}$  ~  $10^{-6}$  mol/L)分别干预 24、48、72 h,用实时荧光定量 PCR 法检测 MG63 细胞 I 型胶原 A1 基因 mRNA 的表达量,分析量效关系和时效关系,以  $17\beta$ -雌二醇作为阳性对照。结果 瘦素可上调 MG63 细胞 I 型胶原 A1 基因 mRNA 的表达,并存在浓度依赖和时间依赖效应,其最佳浓度为  $10^{-7}$  mol/L,最佳作用时间点为 72 h。 $17\beta$ -雌二醇则以  $10^{-7}$  mol/L 浓度组在 24 h 表达为最强。结论 瘦素可上调 MG63 细胞 I 型胶原 A1 基因 mRNA 的表达,其作用较  $17\beta$ -雌二醇持久和滞后。

**关键词:** 瘦素; MG63; 实时荧光定量 PCR; I 型胶原

doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.10.004

## Effects of leptin on expression of alpha1 (I) collagen gene in human osteoblast-like cell line MG63 cells

PENG Mian, CHEN Shu, CAI Xiao-hua, et al. The First Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, China

**Abstract:** **Objective** To examine the effects of leptin on alpha1 (I) collagen gene expression in human osteoblast-like cell line MG63. **Methods** MG63 cells were incubated with different doses of leptin ( $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  mol/L) for 24, 48, 72 h. The real time fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) was performed to detect the mRNA expression of alpha1 (I) collagen gene in MG63 cells, with  $17\beta$ -E<sub>2</sub> as positive control. **Results** Alpha1 (I) collagen gene expression regulated by leptin showed a dose-dependent and time-dependent manners, with the best effect concentration at  $10^{-7}$  mol/L, and maximal expression at 72 h. As positive control,  $17\beta$ -E<sub>2</sub> also reached its maximal effect in  $10^{-7}$  mol/L group at 24 h. **Conclusions** Leptin up-regulated alpha1 (I) collagen gene expression in MG63, which is more enduring and later than that of  $17\beta$ -E<sub>2</sub>.

**Key words:** Leptin; MG63; Real time fluorescence quantitative PCR; Alpha1 (I) collagen gene

瘦素(Leptin, LP)是 1994 年由美国学者发现并克隆的一种主要由白色脂肪组织合成及分泌的肽类激素,它与 LP 受体结合后,主要参与调节人和动物的摄食及能量代谢活动。最新的研究<sup>[1]</sup>发现,与体型瘦弱者相比,肥胖者发生骨质疏松症的危险性较低,且往往伴有血清 LP 的明显升高,提示 LP 可能参与骨代谢的调节。但目前关于 LP 调节骨代谢的机制研究尚无定论:LP 可能直接作用于骨髓基质细胞和破骨细胞,促进骨髓基质细胞转化为成骨细胞,并

抑制破骨细胞功能,从而促进骨形成<sup>[2,4]</sup>;LP 也可能间接通过中枢神经和/或交感神经系统释放相应的介质,后者再作用于骨细胞而抑制骨形成<sup>[2,5,6]</sup>。本研究拟探讨 LP 对成骨样细胞 MG63 (Human osteoblast-like cell line MG63)的直接作用,应用实时荧光定量 PCR (real time fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR) 技术检测 MG63 细胞在增殖阶段的特异性表达产物——I 型胶原 (Type I collagen, COL I) A1 基因 mRNA 的水平,以检测 LP 对 MG63 细胞分化功能的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和仪器

MG63 购自美国培养保存中心(ATCC 号: CRL-

基金项目: 广东省卫生厅科研课题(A2002293)

作者单位: 515041 广东 汕头 汕头大学医学院第一附属医院 (彭绵); 广州医学院第二附属医院(陈澍); 广东省普宁市人民医院 (蔡晓华、彭晓容、彭逸潮)

通讯作者: 彭绵, Email: pengmian@tom.com

1427,来源于14岁的女性成骨肉瘤患者);LP、17 $\beta$ -雌二醇(17 $\beta$ -E<sub>2</sub>)购自美国Sigma公司;无酚红DMEM培养基、Trizol购自美国Invitrogen公司;引物和荧光探针,由广州中山大学达安基因公司合成;核酸回收试剂盒(QIAquick GelExtraction Kit)、逆转录试剂盒Omniscript RT Kit,购自德国Qiagen公司;Taq酶购自广州中山大学达安基因公司;定量PCR试剂盒购自美国ABI公司。7000型荧光PCR仪、PE9600PCR仪为美国Perkin Elmer公司产品;紫外分光光度计UV mini1240为日本SHIMADZU公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** :MG63以含10%胎牛血清的无酚红DMEM培养于5%CO<sub>2</sub>/95%空气、饱和湿度的37℃环境,培养液中含100 U/mL青霉素、100  $\mu$ g/mL链霉素及5 mmol/L的HEPES,每3天传代1次。

**1.2.2 细胞分组及药物干预** :将MG63按每瓶8  $\times$  10<sup>5</sup>细胞的浓度接种于25 cm<sup>2</sup>培养瓶中,用含10%FBS的DMEM培养液培养,每瓶4 mL。48 h后吸去培养液,PBS洗2次,用0.1%FBS-DMEM继续培养6 h,使细胞同步化,6 h后吸去培养液,PBS洗2次,换以3个浓度(10<sup>-8</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup> mol/L)的LP(LP以0.1%FBS-DMEM溶解),每瓶4 mL,每个浓度3瓶;以3个相对应浓度的17 $\beta$ -E<sub>2</sub>(17 $\beta$ -E<sub>2</sub>同样以0.1%FBS-DMEM溶解)作为阳性对照,以0.1%FBS-DMEM作为阴性对照。得出LP、17 $\beta$ -E<sub>2</sub>的最佳作用浓度后,取其最佳浓度,进行荧光PCR反应。

**1.2.3 引物设计** :考虑细胞所含目的基因的量少,采用巢式引物。COL1A1(F)ACCTCAAGATGTGCC-ACTCT(R)TACACGCAGGTCTCACCAGT,长度121 bp;COL1A1(内围F)TGGAAGACTGGAGACTACTGG-ATTG(内围R)CCATGTTGCAGAAGACTTTGATG,长度76 bp;COL1A1(TaqMan探针):5'-FAM-CCAACC-AAGGCTGCAACCTGGATAMRA-3',长度22 bp。

**1.2.4 RNA的抽提、定量与电泳** :药物干预后,用Trizol按操作说明抽提总RNA。每样品取5  $\mu$ L RNA电泳,以判断RNA有无降解;紫外分光光度计测总RNA A<sub>260</sub>、A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>的比值,计算其纯度和浓度。

**1.2.5 逆转录反应** :取总RNA 0.4  $\mu$ g,用逆转录试剂盒合成cDNA。条件如下:5  $\times$  RT缓冲液4  $\mu$ L, MMLV(10 U/ $\mu$ L)2  $\mu$ L, dNTPs(10 mM)0.4  $\mu$ L, COL I A1 F(25  $\mu$ M)0.4  $\mu$ L, COL I A1 R(25  $\mu$ M)0.4  $\mu$ L,总RNA 0.4  $\mu$ g,加无RNA酶的DEPC水至终体积20  $\mu$ L,37℃1 h,95℃3 min。

**1.2.6 阳性标准模板的制备** :取一逆转录反应产物cDNA 5  $\mu$ L,按以下体系反应:5  $\times$  PCR缓冲液10  $\mu$ L, COL I A1 F(25  $\mu$ M)1  $\mu$ L, COL I A1 R(25  $\mu$ M)1  $\mu$ L, dNTPs(10 mM)1  $\mu$ L, Taq酶(2 U/ $\mu$ L)2  $\mu$ L, cDNA 5  $\mu$ L,加无酶水至总体积50  $\mu$ L,反应条件为:93℃2 min,然后93℃1 min,55℃1 min,72℃1 min,共40个循环,最后是72℃7 min延伸。

PCR扩增产物经2%低熔点琼脂糖凝胶电泳,在长波紫外下,割下目的条带。用回收试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit)回收纯化。测定A<sub>260</sub>、A<sub>280</sub>,以A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> > 1.8作为纯度合格的标准。用A<sub>260</sub>测定值和片段长度数据换算出浓度(copy/ $\mu$ L),再做10倍梯度稀释,制备成阳性定量标准品梯度。荧光定量阴性质控标准品采用灭菌双蒸水。

**1.2.7 巢式PCR反应** :取各样本的逆转录反应产物cDNA 5  $\mu$ L,按以下体系反应:5  $\times$  PCR缓冲液5  $\mu$ L, COL I A1 F(25  $\mu$ M)0.5  $\mu$ L, COL I A1 R(25  $\mu$ M)0.5  $\mu$ L, dNTPs(10 mM)0.5  $\mu$ L, Taq酶(2 U/ $\mu$ L)1  $\mu$ L, cDNA 5  $\mu$ L,加无酶水至总体积25  $\mu$ L,反应条件为:93℃2 min,然后93℃45 s,55℃30 s,72℃45 s,共20个循环,最后是72℃7 min延伸。

**1.2.8 荧光定量PCR反应** :取各逆转录反应产物cDNA 5  $\mu$ L,按以下体系反应:5  $\times$  PCR缓冲液10  $\mu$ L, COL I A1 F(内围25  $\mu$ M)1  $\mu$ L, COL I A1 R(内围25  $\mu$ M)1  $\mu$ L, dNTPs(10 mM)1  $\mu$ L, Taq酶(3 U/ $\mu$ L)1  $\mu$ L, FAM 1  $\mu$ L, cDNA 5  $\mu$ L,加无酶水至总体积50  $\mu$ L,反应条件为:93℃2 min,然后93℃45 s,55℃45 s,共40个循环。

## 1.3 统计学处理

采用SPSS 11.0统计学软件分析及作图,拷贝数以 $\bar{x} \pm s$ 表示;采用单因素方差分析比较各不同浓度组间的差异,两样本均数之间比较用 $t$ 检验,两样本率之间比较用 $u$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 荧光定量

图1所示为阳性质控品经10~10<sup>4</sup>倍稀释后进行荧光PCR扩增反应的动力学曲线。以起始拷贝数的自然对数为横坐标,循环阈值为纵坐标,可得一直线型阳性标准回归曲线,线性相关系数 $r = 0.9955$ 。图2为各样本的扩增图,各样本的扩增曲线正常,阴性对照组的曲线几乎与基线平行,说明此反应体系中不存在PCR污染,结果可靠。

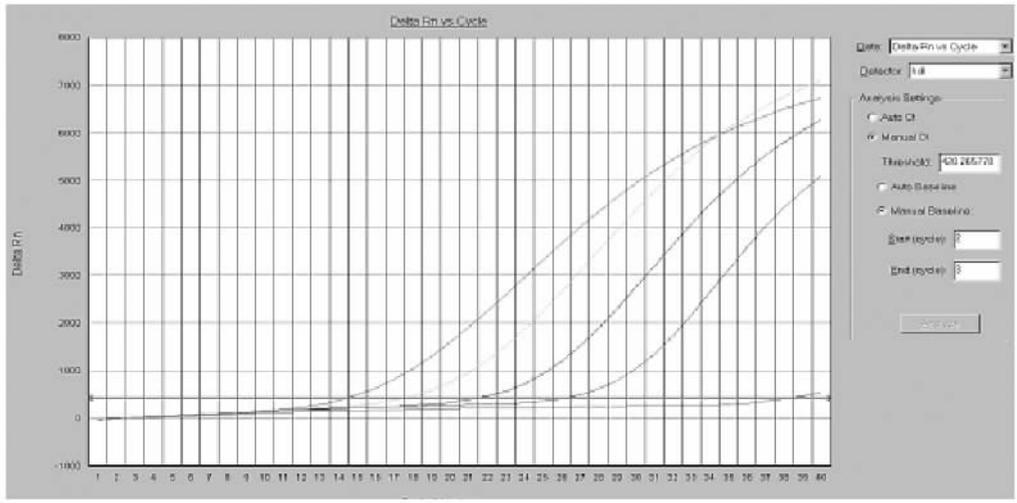


图1 阳性标准品扩增图

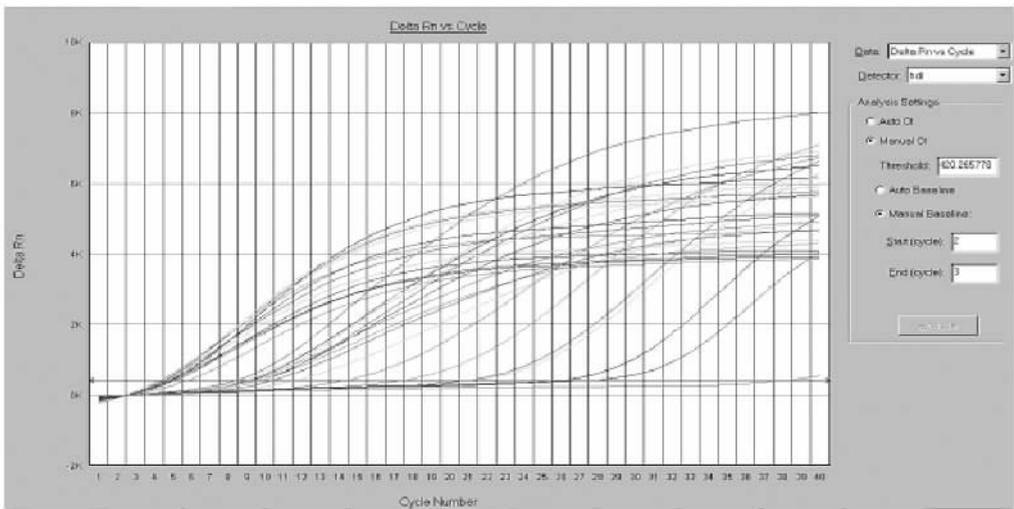


图2 各样品扩增图

2.2 不同浓度的药物干预 24 h 对 MG63 COL I A1 mRNA 表达的影响(见表 1)

LP、17β-E<sub>2</sub> 组内不同浓度间的拷贝数差异有显

著意义 (F 值分别为 890.963、2165.315, 均为 P < 0.05)。在 10<sup>-8</sup> ~ 10<sup>-6</sup> mol/L 浓度时, LP、17β-E<sub>2</sub> 的最佳药物浓度均为 10<sup>-7</sup> mol/L。

表 1 不同浓度的 LP、17β-E<sub>2</sub> 干预 24 h 后 MG63 COL I A1 mRNA 表达的拷贝数 (x̄ ± s)

药物	药物浓度 (mol/L)			
	0	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>
LP	33.11 × 10 <sup>10</sup> ± 0.26 × 10 <sup>10</sup> △	72.58 × 10 <sup>10</sup> ± 2.47 × 10 <sup>10</sup> △▲	83.07 × 10 <sup>10</sup> ± 2.97 × 10 <sup>10</sup> △▲	50.08 × 10 <sup>10</sup> ± 1.38 × 10 <sup>10</sup> △▲
17β-E <sub>2</sub>	33.11 × 10 <sup>10</sup> ± 0.26 × 10 <sup>10</sup> △	81.31 × 10 <sup>10</sup> ± 1.75 × 10 <sup>10</sup> △▲	98.10 × 10 <sup>10</sup> ± 2.16 × 10 <sup>10</sup> △▲	87.43 × 10 <sup>10</sup> ± 1.63 × 10 <sup>10</sup> △▲

注: 同种药物不同浓度之间的比较(单因素方差分析): LP 组: F = 890.963, 17β-E<sub>2</sub> 组: F = 2165.315, △ P < 0.05; 相同浓度(10<sup>-8</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup> mol/L)的 LP 与 17β-E<sub>2</sub> 组比较 (t 检验): t 值分别为 4.982, 7.080, 30.342, ▲ P < 0.05

2.3 最佳浓度的 LP、17β-E<sub>2</sub> 干预 24、48、72 h 对 MG63 COL I A1 mRNA 的表达及其上调率的影响

LP 及 17β-E<sub>2</sub> 对 COL1A1 基因 mRNA 的表达均

存在明显的上调作用, LP 随时间而递增, 17β-E<sub>2</sub> 则随时间而递减。上调率(%) = (各种药物 COL I A1 mRNA 拷贝数 - 空白对照组 COL I A1 mRNA 拷贝

数)空白对照组 COL I A1 mRNA 拷贝数 × 100%。

表2 10<sup>-7</sup> mol/L的 LP、17β-E<sub>2</sub> 干预 24、48、72 h对 MG63 COL I A1 mRNA 表达的影响(  $\bar{x} \pm s$ , 拷贝数 )

药物	干预时间		
	24 h	48 h	72 h
阴性对照(0.1% FBS-DMEM)	31.88 × 10 <sup>10</sup> ± 0.65 × 10 <sup>10</sup>	32.28 × 10 <sup>10</sup> ± 0.85 × 10 <sup>10</sup>	32.32 × 10 <sup>10</sup> ± 0.93 × 10 <sup>10</sup>
LP	86.52 × 10 <sup>10</sup> ± 0.55 × 10 <sup>10</sup> ◻ ◼	87.32 × 10 <sup>10</sup> ± 0.21 × 10 <sup>10</sup> ◻ ◼	88.15 × 10 <sup>10</sup> ± 0.10 × 10 <sup>10</sup> ◻ ◼ ◽
17β-E <sub>2</sub>	102.75 × 10 <sup>10</sup> ± 6.29 × 10 <sup>10</sup> ◽	100.77 × 10 <sup>10</sup> ± 4.55 × 10 <sup>10</sup> ◽	98.60 × 10 <sup>10</sup> ± 6.54 × 10 <sup>10</sup> ◽

注:同种药物不同作用时间之间的比较:LP组:F=16.832,17β-E<sub>2</sub>组:F=10.581,△P均<0.05 相同时间点的LP与阴性对照组比较:t值分别为111.007,109.400,103.482,◻P<0.05,LP与17β-E<sub>2</sub>组比较:t值分别为4.453,5.115,7.112,◼P<0.05

取最佳浓度(10<sup>-7</sup> mol/L)的LP干预MG63,结果显示:LP对MG63 COL I A1 mRNA表达的促进作用存在显著的时间依赖效应,随着时间从24、48 h增加至72 h,各浓度的LP作用均逐渐增强,其最佳时间点为72 h;17β-E<sub>2</sub>作用则随时间递增而减弱,其最佳时间点为24 h。

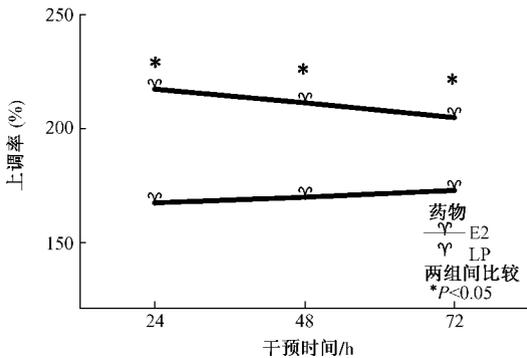


图3 最佳浓度(10<sup>-7</sup> mol/L)的LP、17β-E<sub>2</sub> 干预 24、48、72 h对 MG63 COL I A1 基因 mRNA 表达上调率(%)影响的比较

### 3 讨论

本实验所用的人成骨肉瘤细胞株 MG63 来源于 14 岁的女性成骨肉瘤患者,是具有无限传代功能的多倍体细胞株,能产生大量胶原,具有体外矿化能力,具有成骨细胞的所有特性,其发育经历细胞增殖、细胞外基质成熟、细胞外基质矿化和细胞凋亡 4 个阶段。成熟的 OB 分泌大量的细胞外基质(extracellular matrix, ECM),ECM 的不断积累和成熟使 OB 本身的增殖逐渐停止,并开始表达一系列的基因,诱导基质成分的矿化。其中,I 型胶原占 90% 以上,主要构成矿物质沉积和结晶的支架,I 型胶原是一个异质三联体蛋白,由两条 α<sub>1</sub> 及一条 α<sub>2</sub> 链构成,分别由位于 17q21.3 ~ q22 的 COL1A1 及

7q21.3 ~ q22 的 COL1A2 基因编码。与 OB 在基质矿化阶段的表达产物——骨钙素及成熟阶段的表达产物——碱性磷酸酶相比,I 型胶原更能特异性地表达 OB 在增殖阶段的产物,其含量与骨的生物力学特性密切相关。

本实验以 LP(10<sup>-8</sup> ~ 10<sup>-6</sup> mol/L)干预 MG63,结果发现:LP 可上调 MG63 COL1A1 基因 mRNA 的表达,并存在剂量依赖效应和饱和效应,以 10<sup>-7</sup> mol/L 浓度组为最强,10<sup>-8</sup> mol/L、10<sup>-6</sup> mol/L 作用则较弱,其曲线呈抛物线型(见表 1)。最佳浓度(10<sup>-7</sup> mol/L)的 LP 干预 24、48、72 h 对 COL1A1 基因 mRNA 表达的影响存在明显的时间依赖效应,以 72 h 作用为最强,与 24、48 h 相比,LP 干预 72 h 后对 COL I A1 mRNA 表达的上调作用有统计学意义(P < 0.05)。阳性对照 17β-E<sub>2</sub> 对 MG63 COL1A1 基因 mRNA 表达的促进作用存在明显的时间效应:10<sup>-7</sup> mol/L 浓度组在 24 h 表达为最强。与 17β-E<sub>2</sub> 相比,LP 干预 24、48、72 h 对 MG63 COL1A1 基因 mRNA 表达的促进作用均较弱,但随着时间的推移两者的作用有接近的趋势(见图 3),提示 LP 的作用较为持久,并随时间推移而递增;17β-E<sub>2</sub> 作用则较为短暂、随时间推移而递减。延长一段时间后,两种激素对 MG63 的影响未知,尚有待于进一步研究。

与本研究结果相仿,Gordeladze 等<sup>[7]</sup>用原代培养的人髂脊 OB,以浓度为 100 ng/mL(相当于 6.25 × 10<sup>-6</sup> mol/L)的 LP 持续干预 35 d,结果显示:LP 能明显促进 OB 胶原合成,刺激 OB 增殖、分化及矿化,保护分化成熟的 OB,减少凋亡,并促使 OB 转化为骨细胞。Steppan 等<sup>[8]</sup>用 RT-PCR 技术,在原代培养的 OB 上检测到 OB-Rb 的表达;Reseland 等<sup>[9]</sup>进一步研究发现,LP 的表达仅在 OB 矿化和/或骨转换阶段方可检测到,在骨基质成熟阶段则检测不到,且 LP 可

使处于矿化阶段的 OB 中矿化结节的形成数量明显增加,提示 LP 可通过与 OB 上相应受体结合,在 OB 发育及骨矿化的过程中促进骨量增加。

与上述基础研究一致,临床研究亦提示:LP 对骨代谢具有正性调节作用。Yamauchi 等<sup>[10]</sup>和 Pasco 等<sup>[11]</sup>分别研究日本和南澳大利亚妇女 LP 与骨量的关系,结果显示,血清 LP 浓度与股骨骨密度呈正相关,这种相关性独立于体脂含量及年龄的影响而存在,提示 LP 对骨代谢具有正性调节作用。随着研究的深入,血清 LP 作为一种可测定激素,将可能成为代谢性骨病新的标志物,而 LP 有可能成为防治骨质疏松症的新一代药物。

既往的研究多放在 LP 对骨转换的敏感指标——I 型胶原代谢产物的影响,本研究从基因检测的角度揭示了 LP 可上调 MG63 细胞 COL I A1 基因 mRNA 的表达,并存在剂量和时间效应。进一步研究胶原基因的表达调控,有利于开发抗骨质疏松的新药。

### 【参 考 文 献】

[ 1 ] Reid IR. Relationships among body mass, its components, and bone. *IBMS Bone KEY*, 2002, 1: 200-205.  
[ 2 ] Peng Mian, Ma Yanfen, Chen Shu. Research progress of leptin's influence to bone mass. *Foreign Medical Sciences·Section of Internal Medicine*, 2004, 31(6): 267-270, 276 (in Chinese).

[ 3 ] Thomas T, Gori F, Khosla S, et al. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*, 1999, 140: 1630-1638.  
[ 4 ] Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, et al. Leptin inhibits osteoclasts generation. *J Bone Miner Res*, 2002, 17: 200-209.  
[ 5 ] Ducy P, Amling M, Takeda S, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, 2000, 100: 197-207.  
[ 6 ] Baskin DG, Breininger JF, Schwartz MW. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Diabetes*, 1999, 48: 823-833.  
[ 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. *J Cell Biochem*, 2002, 85: 825-836.  
[ 8 ] Stepan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, et al. Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regulatory Peptides*, 2000, 92: 73-78.  
[ 9 ] Reseland JE, Syversen U, Bakke I, et al. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 1426-1433.  
[ 10 ] Yamauchi M, Sugimoto T, Yamaguchi T, et al. Plasma leptin concentrations are associated with bone mineral density and the presence of vertebral fractures in postmenopausal women. *Clin Endocrinol*, 2001, 55: 341-347.  
[ 11 ] Pasco JA, Henry MJ, Kotowicz MA, et al. Serum leptin levels are associated with Bone mass in nonobese women. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86: 1884-1887.