

• 论著 •

铁调素对成骨细胞骨相关基因表达的影响

赵理平 张伟 刘虎 肖丽 王爱东 张鹏 马勇 徐又佳

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108 (2010) 12-0920-05

摘要: 目的 研究铁调素对人成骨细胞(hFOB1.19) I 型胶原(COL1)、骨保护素(OPG)、骨钙素(BGP)基因表达的影响。方法 成骨细胞在 34℃ 下进行体外培养,以不同浓度铁调素(50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L、400 nmol/L)干预 72 h 后,收集细胞,分别抽取总 RNA,采用半定量 RT-PCR 法检测成骨细胞中 COL1、OPG、BGP mRNA 表达的变化。结果 RT-PCR 检测显示不同浓度铁调素干预后,各组 COL1、OPG、BGP mRNA 均有表达;不同浓度组的 COL1、OPG、BGP mRNA 表达光密度比值不同,组间密度比值比较存在统计学意义($P < 0.05$),但铁调素在 400 nmol/L 时抑制 OPG 的表达($P < 0.05$)。结论 铁调素可上调成骨细胞(hFOB1.19) COL1、OPG、BGP mRNA 表达,铁调素浓度增加转录水平逐渐增加,显示有浓度依赖性。

关键词: 铁调素; 人成骨细胞; 体外培养; 基因表达

The Effects of hepcidine on osteoblast-related gene expression ZHAO Liping, ZHANG Wei, LIU Hu, et al. Department of Orthopaedics, The Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China
Corresponding author: XU Youjia, Email: xuyoujia@medmail.com.cn

Abstract: Objective To investigate the effects of hepcidin on the gene expressions of osteoprotegerin (OPG), Collagen-I (COL1), and osteocalcin (BGP) in human hFOB1.19 osteoblasts *in vitro*. **Methods** The osteoblasts were cultured at 34℃ *in vitro*. The cultures were additioned with different concentrations of hepcidin (50 nmol/L, 100 nmol/L, 200 nmol/L, and 400 nmol/L, respectively) for 72 h. The cells were collected and the total RNA was isolated. Expressions of COL1, OPG, and BGP mRNA were detected with semiquantitative RT-PCR. **Results** The result of RT-PCR showed that the mRNAs of COL1, OPG, and BGP were all expressed after the intervention of hepcidine with different concentrations. The density ratios of COL1, OPG, and BGP mRNA differed among the different hepcidin concentration groups, which showed statistical differences ($P < 0.05$). Hepcidin inhibited the mRNA expression of BGP at the concentration of 400 nmol/L ($P < 0.05$). **Conclusion** Hepcidin upregulated the expression of COL1, OPG and BGP mRNA in hFOB1.19 osteoblasts. Hepcidine dose-dependently stimulated the level of transcription.

Key words: Hepcidin; Human osteoblasts; *In vitro* culture; Gene expression

铁调素(hepcidin)是 Park^[1]2001 年首次分离出的一种调节铁代谢的类激素,它在调节哺乳动物体内的铁动态平衡中发挥着重要作用。2006 年 Babitt 等^[2]研究发现在体外肝细胞中,BMP 信号通路能够正性调节铁调素的表达。2009 年 Billy 等^[3]在《Nature》上发表文章指出 BMP-6 是调节铁调素表达和铁代谢的关键因子。同年 Sarah 等^[4]研究报道

BMP-2 能增加铁调素的表达和降低血清铁的水平。而有研究报道 BMP 对骨质疏松及骨不连有治疗作用^[5],提示铁调素可能参与骨代谢过程。本实验研究采用 RT-PCR 方法检测铁调素对人成骨细胞(hFOB1.19)骨相关基因表达的影响,以探讨铁调素与骨代谢的关系,为防治骨质疏松症提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料、仪器

铁调素(购自日本 Peptide Institute),成骨细胞(hFOB1.19)(购于中科院上海细胞库),DMEM(高糖)/F12(Gibco),新生胎牛血清(FCS,杭州四季

基金项目:江苏省医学重点人才项目(RC2007100);江苏省自然科学基金(BK2008165);江苏人事厅六大高峰(07-B-032)

作者单位:215004 苏州,苏州大学附属第二医院骨科

通讯作者:徐又佳,Email: xuyoujia@medmail.com.cn

青),胰蛋白酶(1:250, AMRESCO), dTNP、TaqDNA 聚合酶及其酶缓冲液,标准 1000 bpDNA maker(MBI Ferments), Trizol (Ivitrigen), CO₂ 培养箱(瑞士 Heraeus 公司),超净工作台(苏州超净设备厂),低温高速离心机(Epen-doff 公司),紫外分光光度计(U22001, HITACHI, 日本),PCR 热循环仪(GeneAmp9700, PE 公司, 美国),电泳仪(Bio-RadPowerPPAC200, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 成骨细胞培养:将 hFOB1.19 放于 5% CO₂ 34℃ 培养箱内培养,细胞培养基为 DMEM(高糖):F12=1:1,添加终浓度为 10% 的胎牛血清及终浓度为 0.3% G418。

1.2.2 铁调素(Hepcidin)干预:将不同浓度的 Hepcidin (50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L、400 nmol/L)加入每瓶细胞的培养基内,继续培养,72 h 后,收集细胞,提取总 RNA。

1.2.3 总 RNA 抽提、RT-PCR

(1)细胞总 RNA 抽提:接种于 75 cm² 培养瓶内的细胞培养 72 h 后,PBS 冲洗 2 次,加入胰酶消化后,离心,收集细胞于 1.5 ml 的 Eppendorf 管内,加入 Trizol 1 ml,剧烈震荡后,室温静置 5 min,加入氯仿 0.2 ml,盖紧盖后,旋涡振摇 15 s,静置 5 min,12000 r/min 离心 15 min,吸取上层水相移入另一 1.5 ml Eppendorf 管,加入等体积异丙醇,颠倒混匀,室温静置 10 min,12000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入预冷 75% 乙醇 1 ml 洗沉淀,7500 r/min 离心 5 min,弃乙醇,空气中干燥,加入 DEPC 处理水 20 μl 溶解 RNA, -80℃ 保存。

(2)逆转录:将 RNA 于紫外分光光度计检测,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.7~2.0 之间方可使用,用前将 RNA 浓度调整至 1 μg/μl。每个逆转录反应体积为 20 μl:含 10 × RNA PCR bufer 2 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μl, 2.5 mmol/L dNTP 8 μl, Oligo dT 50 pmol, Rnasin 20 U, M-MLV 0.5 μl, 模板 RNA 1 μl, 补加 DEPC 处理水至 20 μl。于热循环仪中 65℃ 5 min 预变性,42℃ 60 min 逆转录,95℃ 5 min 停止反应, -20℃ 保存。

(3)聚合酶链式反应:总反应体积为 50 μl,内含 10 × PCR buffer 5 μl,逆转录产物 4 μl, Taq 酶 1.5 μl,上下游引物各 50 pmol, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μl, 2.5 mmol/L dNTP 4 μl 补加灭菌去离子水至 50 μl。于热循环仪中 94℃ 3 min 再进行 94℃ 30 s, 58℃ 40 s, 72℃ 30 s, 共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min,

-4℃ 保存。

1.2.4 PCR 产物鉴定和分析:取 PCR 扩增产物 8 μl 和上样缓冲液 2 μl 点样于 1.5% 琼脂糖凝胶, 110 V 电压下电泳 0.5 h,于紫外线箱中观察并照相记录。实验重复 3 次,用 Image J 图像分析软件对目的基因和参照基因条带光密度值进行密度分析。引物合成:引物序列:Beta-actin, I 型胶原(collagen I, COL1), 骨钙素(osteocalcin, BGP), 骨保护蛋白(osteoprotegerin, OPG), 根据 Genbank 与 Primer 3 设计,引物序列如下(表 1)。

表 1 β-actin、COL1、OPG、BGP 基因的引物序列及分子大小(bp)

基因	引物序列	bp
β-actin	上游 5'-TCCTGTGGCATCCACGAAACT-3'	306 bp
	下游:5'-GAAGCATTTCGGTGGACCAT-3'	
COL1	上游:5'-GATGCCAATGTGTTTCGTG-3'	104 bp
	下游:5'-TTCTTTCGGCTGCCCTCT-3'	
OPG	上游:5'-GGAGCAGAAGACATTGAA-3'	260 bp
	下游:5'-TGGACCTGTTACCTATC-3'	
BGP	上游:5'-AGGGCAGCGAGGTAGTGA-3'	150 bp
	下游:5'-GGCAGCGAGGTACTGAAGAG-3'	

1.2.5 统计学处理:所有试验重复操作 3 次,实验所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。利用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析,后采用 SNK 法进行两两比较。 $P < 0.05$ 表示有差异,存在统计学意义。

2 结果

2.1 成骨细胞总 RNA 质量鉴定

提取的总 RNA 通过琼脂糖凝胶电泳,5 s、18 s、28 s 3 条带清晰完整,可见提取的 mRNA 是完整的,基本没有降解现象(见图 1)。通过 A₂₆₀/A₂₈₀ 测定,所有提取的 RNA 值在 1.8~2.0 之间。证实所提取的总 RNA 完整性和纯度均满足进一步实验的要求。

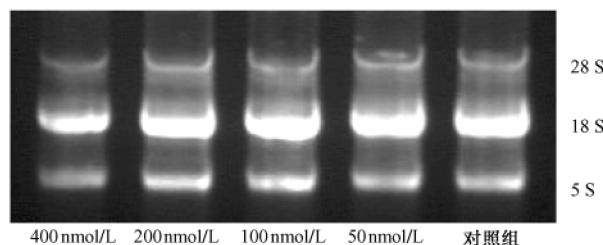


图 1 人成骨细胞组提取 TotalRNA 后电泳鉴定结果

2.2 PCR 产物分析

不同浓度组的铁调素及对照组作用成骨细胞

(hFOB1.19) 72 h 后,提取细胞总 RNA 后进行 RT-PCR,均有条带显示(见图 2)。从图 2 可以看出, COL1、OPG、BGP mRNA 基因表达量随铁调素浓度

的升高而增多,目的 DNA 条带亮度逐渐增强,具有剂量依赖性。

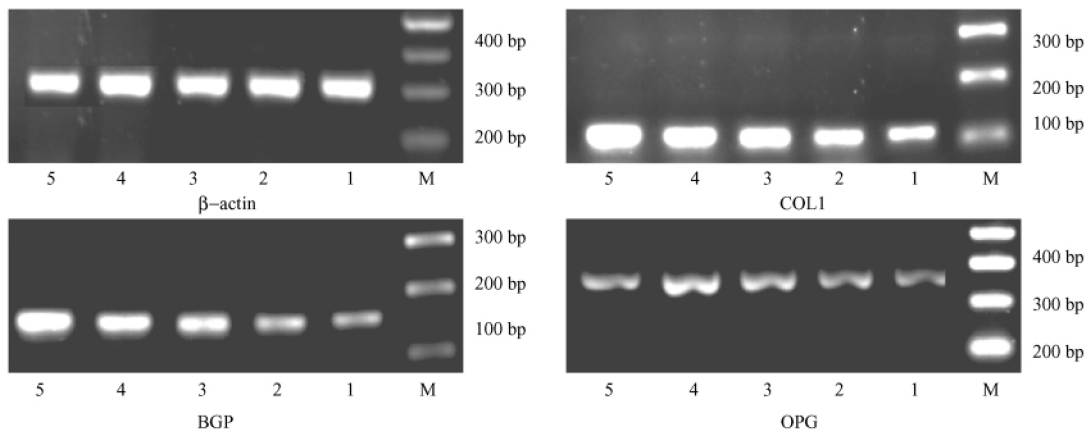


图 2 RT-PCR 检测不同浓度铁调素干预后成骨细胞 β -actin、COL1、OPG、BGP 的基因表达情况

注:M:Marker;1:对照组;2:Hepcidin 50 nmol/L;3:Hepcidin 100 nmol/L;4:Hepcidin 200 nmol/L;5: Hepcidin 400 nmol/L

2.3 骨相关基因表达的变化趋势

通过 BIORAD 凝胶成像系统 Quantity One-4.6.5 分析仪对 β -actin、COL1、OPG、BGP 基因条带进行像素值测定,测得各扩增条带的光密度值,并与 β -actin 用基因扩增条带的光密度值比较。光密度比值统计学结果:三种指标组与对照组数值比较均有提高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外, COL1、BGP 各浓度组中,铁调素浓度增加,光密度比值也随之增加,浓度组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而 OPG 指标组中,400 nmol/L 与 200 nmol/L 浓度组的光密度比值比较统计学差异 ($P < 0.05$),但呈抑制效应;而与 50 nmol/L、100 nmol/L 浓度组数据比较,较两者均有增加,差异有统计学意义

($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度 Hepcidin 作用下 COL1、BGP、OPG 与 β -actin 的光密度比值 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	COL1/ β -actin	BGP/ β -actin	OPG/ β -actin
对照组	$0.61 \pm 0.040^*$	$0.23 \pm 0.047^{\#}$	$0.16 \pm 0.036^*$
50 nmol/L	$0.99 \pm 0.040^*$	$0.51 \pm 0.056^{\#}$	$0.35 \pm 0.047^*$
100 nmol/L	$1.30 \pm 0.040^*$	$0.77 \pm 0.038^{\#}$	$0.57 \pm 0.030^*$
200 nmol/L	$1.74 \pm 0.061^*$	$1.00 \pm 0.087^{\#}$	$0.85 \pm 0.041^{\Delta}$
400 nmol/L	$2.35 \pm 0.090^*$	$1.32 \pm 0.096^{\#}$	$0.60 \pm 0.015^{\Delta}$

注:* 组间比较 $P < 0.05$,有统计学意义;#组间比较 $P < 0.05$,有统计学意义;* 组间比较 $P < 0.05$,有统计学意义;* 与 Δ 组间比较 $P < 0.05$,有统计学意义; Δ 组间比较 $P < 0.05$,有统计学意义,但呈抑制效应

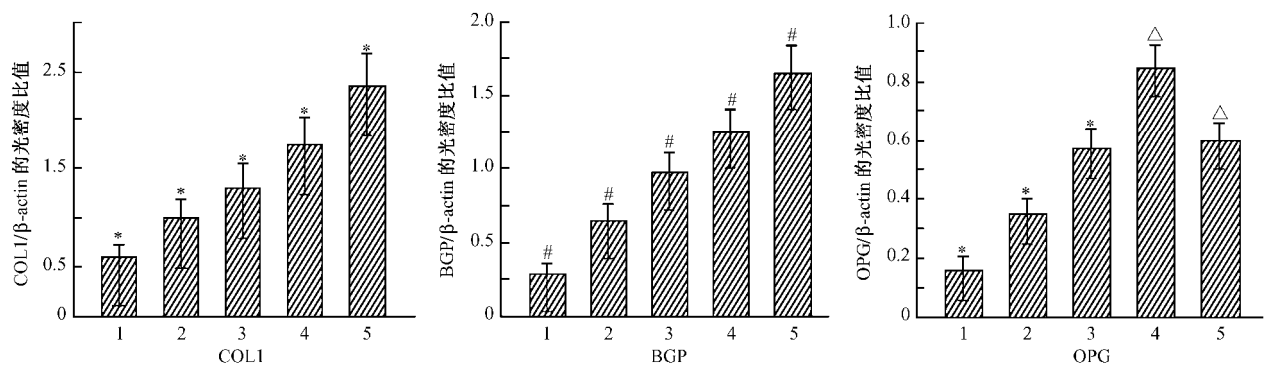


图 3 不同浓度 Hepcidin 对 COL1、OPG、BGP 基因表达的变化趋势

注:1:对照组;2:铁调素 50 nmol/L;3:铁调素 100 nmol/L;4:铁调素 200 nmol/L;5:铁调素 400 nmol/L, COL1、OPG 的表达量随铁调素浓度的增加而增多 ($P < 0.05$),而 BGP 在铁调素浓度为 50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L 时,其基因表达量随铁调素浓度的升高而增多,但在浓度为 400 nmol/L 时,其基因表达量减少,与 200 nmol/L 浓度组比较有显著差异性 ($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 铁调素与 BMPs

铁调素 (hepcidine) 是新近发现的一种多肽类物质,其主要作用是下调铁超载;而骨形态发生蛋白 (Bone morphogenetic proteins/BMPs) 属于转化生长因子 b 超家族成员,具有诱导未分化的间充质干细胞向成软骨细胞和成骨细胞定向分化与增殖的能力,促进成骨细胞分化成熟,参与骨和软组织的生长及其重建过程,进而加速骨缺损的修复。2009 年 Billy 等^[3]在《Nature》上发表文章指出 BMP-6 是调节铁调素表达和铁代谢的关键因子,他们发现敲除 BMP-6 基因老鼠的临床表现都出现血清铁调素含量下降和各组织器官铁沉积。2010 年 Arndt 等^[6]研究报告,BMP6^{-/-}老鼠肝脏内铁严重积聚,而铁调素表达明显增多,而给予 BMP6^{+/+}老鼠饮食铁或安泰乐后,能明显上调 BMP6 的表达,进一步研究发现,给予 BMP6^{-/-}老鼠饮食铁后,其小肠的 BMP2、BMP4、BMP9 表达增多,研究认为小肠细胞可能是铁过载时 BMP-6 合成的主要来源。许多试验研究证实 BMPs 在骨质疏松、骨不连等方面起着积极的作用^[5,7,8],提示铁调素可能通过 BMPs 途径参与骨代谢过程。

3.2 铁调素与骨代谢(成骨细胞)的关系

成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,负责骨基质的合成、分泌和矿化。在成骨细胞增殖期成骨细胞数量增加,以形成多层细胞,并合成、分泌 I 型胶原以便最终可以矿化形成骨结节。在成骨细胞分化早期主要是碱性磷酸酶表达,成骨细胞分泌碱性磷酸酶和钙盐结晶至细胞外基质中,碱性磷酸酶使局部磷酸含量增高,促使基质矿化,因此碱性磷酸酶被认为是细胞外基质成熟的早期标志。在成骨细胞进入矿化期,细胞内的碱性磷酸酶活性下降,而与细胞外基质中羟磷灰石沉积相关的基因表达达到高峰,如 I 型胶原、骨桥蛋白、骨钙素等。本实验是国内首次用铁调素直接干预成骨细胞并检测成骨细胞骨相关基因 (COL1、OPG、BGP) 表达情况。结果显示,随着铁调素干预浓度的增加,成骨细胞骨相关基因 COL1、OPG、BGP mRNA 表达量逐渐增多,且有一定剂量依赖性。有实验研究表明铁调素与骨矿化和骨质疏松的形成具有实验相关性^[9],且在骨质疏松模型中铁调素表达与正常组有显著差异^[10]。2008 年张鹏等^[11]在研究铁调素对人成骨细胞内钙离子转运的影响时发现铁调素可以升高成骨细胞内钙离

子浓度。本实验结果与以上学者的研究结果是一致的。

3.3 铁调素与成骨细胞 COL1、OPG、BGP 的关系

本实验用 RT-PCR 方法研究不同浓度铁调素干预成骨细胞 hFOB1.19 后,通过观察 COL1、OPG、BGP mRNA 的表达变化来观察铁调素对成骨细胞活性与功能的影响。实验结果提示:铁调素促进成骨细胞 COL1、OPG、BGP mRNA 的表达,并具有一定的剂量相关性。由此推测,铁调素在成骨细胞成熟过程中,一方面通过上调 COL1、BGP 的表达,可能加速成骨细胞的矿化过程,对骨形成有积极作用。2010 年刘虎等^[12]研究发现铁调素干预小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞细胞株后,骨保护蛋白及骨钙素的表达量明显增多,这与本实验结果是一致的,说明铁调素作用不同种属的细胞株其效应是一致的;另一方面通过促进 OPG 的表达,可能参与抑制破骨细胞的生成过程,抑制骨吸收。有关进一步研究铁调素对成骨细胞活性及功能变化和成骨细胞相关基因蛋白表达的影响尚待进一步研究。

铁调素可能在铁代谢和骨代谢之间起着桥梁作用,但三者之间的具体机制尚不明确。随着铁调素本身以及相关研究的深入,其作用机制将会进一步明确,其在骨代谢以及铁代谢中的作用也会更加清晰。本研究结果对我们将来用铁调素作为干预铁代谢的手段,进而干预骨代谢提供了实验依据,为进一步防治骨质疏松症提供了新的思路和方法。

【参 考 文 献】

- [1] Park CH, Valore EV, Waring AJ, et al. Hecpudin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. J Biol Chem, 2001, 276:7806-7810.
- [2] Babbitt JL, Huang FW, Wrighting DM, et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. Nat Genet, 2006, 38: 531-539.
- [3] Billy Andriopoulos Jr, Elena Corradini, Jodie L. Babbitt, et al. BMP-6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism Nat Genet, 2009, 41 (4): 482-487.
- [4] Sarah AB, Donal R. Potential role of bone morphogenetic protein (BMP) signaling as a potential therapeutic target for modification of iron balance. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24: 28-30.
- [5] Petra Simc, Jasminka Buljan Culej, Lva Orlic, et al. Systemically administered bone morphogenetic protein-6 restores bone in aged ovariectomized rats by increasing bone formation and suppressing bone resorption. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281: 25509-25521.

(下转第 976 页)

(上接第 923 页)

- [6] Atndt S, Maegdefrau U, Dorn C, et al. Iron-induced expression of bone morphogenic protein 6 in intestinal cells is the main regulator of hepatic hepcidin expression *in vivo*. *Gastroenterology*, 2010, 138: 372-382.
- [7] Po-Lin K, Yu-Ting H, Cheng-Hsiung, et al. Bone morphogenetic protein-2 and -4 (BMP-2 and -4) mediates fraxetin-induced maturation and differentiation in human osteoblast-like cell lines. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29: 119-124.
- [8] W A Grasser I, Orlic F, Borovecki K, et al. BMP-6 exerts its osteoinductive effect through activation of IGF-1 and EGF pathways. *International Orthopaedics*, 2007, 31: 759-765.
- [9] 徐又佳, 钱忠明, 俞晨. 铁调素在骨矿化中作用. *中国骨质疏松杂志*, 2005, 11: 541-543.
- [10] 徐又佳, 马勇, 钱忠明, 等. 骨质疏松模型体内铁调素 (Hepcidin) 基因表达的相关研究. *中国骨质疏松杂志*, 2007, 13(11): 686-691.
- [11] 张鹏, 徐又佳, 赵东阳, 等. 铁调素对人成骨细胞 (hFOB 1.19) 内钙离子转运影响的初步研究. *苏州大学学报 (医学版)*, 2008, 28(1): 13-14.
- [12] 刘虎, 徐又佳, 张吉森, 等. 铁调素对 MC3T3-E1 小鼠成骨细胞骨保护素和骨钙素基因表达的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2010, 16(1): 1-4.

(收稿日期: 2010-08-17)