

## 不同浓度锌对成骨细胞 MC3T3-E1 骨保护素基因表达和细胞增殖的影响

杨茂伟 梁单 郭宝磊 曹军军 杨蕾 郭晓东 高志达

中图分类号: R34 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)12-1037-04

**摘要:** 目的 研究不同浓度锌对成骨细胞骨保护素基因表达和细胞增殖的影响。方法 取小鼠的成骨细胞系 MC3T3-E1 培养并随机分为 4 组, A 组加入 10 $\mu$ mol/L 硫酸锌; B 组加入 50 $\mu$ mol/L 硫酸锌; C 组加入 200 $\mu$ mol/L 硫酸锌; D 组作为空白对照。培养 48h 后提取细胞 RNA, RT-PCR 分析成骨细胞骨保护素(OPG)mRNA 表达, Elisa 检测细胞培养上清中骨保护素表达水平。MTT 法测定成骨细胞增殖率。结果 A 组、B 组、C 组与 D 组细胞骨保护素基因表达比值分别为 0.461 $\pm$ 0.051、1.068 $\pm$ 0.123、0.244 $\pm$ 0.044、0.548 $\pm$ 0.089, A 组与 D 组差异不明显, B 组高于 D 组( $P < 0.01$ ), C 组低于 D 组( $P < 0.01$ )。Elisa 结果与 RT-PCR 相同。细胞增殖率之间差异有显著性意义, B 组高于 D 组( $P < 0.01$ ), C 组低于 D 组( $P < 0.01$ )。结论 50 $\mu$ mol/L 的锌促进成骨细胞骨保护素基因表达和细胞增殖, 200 $\mu$ mol/L 的锌则抑制成骨细胞骨保护素基因表达和细胞增殖。而 10 $\mu$ mol/L 的锌对成骨细胞骨保护素基因表达和细胞增殖的影响不大。

**关键词:** 成骨细胞; 锌; 骨保护素; 细胞增殖

**The effect of different concentration of zinc sulfate on the gene expression of osteoprotegerin and cell proliferation of MC3T3-E1 osteoblasts** YANG Maowei, LIANG Dan, GUO Baolei, et al. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Chinese Medical University, Shenyang 110001, China

Corresponding author: YANG Maowei, Email: ymw69@sohu.com

**Abstract: Objective** To explore the effect of different concentration of zinc on the gene expression of osteoprotegerin and cell proliferation of osteoblasts. **Methods** The mouse osteoblast cell line MC3T3-E1 were cultured and randomly divided into 4 groups. Sulfate zinc was added into Group A (10  $\mu$ mol/L), Group B (50  $\mu$ mol/L), and Group C (200  $\mu$ mol/L). Group D was treated as control group. RNA was extracted from cells after 48-hour treatment. The mRNA expression of osteoprotegerin was analyzed using RT-PCR method. The expression of osteoprotegerin in cell culture medium was measured using Elisa method. The proliferation rate of osteoblasts was measured using MTT method. **Results** The mRNA expressions of osteoprotegerin in group A, B, C, and D were 0.461 $\pm$ 0.051, 1.068 $\pm$ 0.123, 0.244 $\pm$ 0.044, and 0.548 $\pm$ 0.089, respectively. The difference between group A and D was not statistically significant. The expression in Group B was higher than that in group D ( $P < 0.01$ ). The expression in Group C was lower than that of group D ( $P < 0.01$ ). The Elisa results were identical with those of RT-PCR. The osteoblast proliferation was significantly different. It was higher in Group B than in group D ( $P < 0.01$ ), and was lower in Group C than in group D ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Zinc of 50  $\mu$ mol/L promotes the gene expression of osteoprotegerin and proliferation of osteoblasts. Zinc of 200  $\mu$ mol/L inhibits the gene expression of osteoprotegerin and proliferation of osteoblasts. There is little effect of 10 $\mu$ mol/L zinc on the gene expression of osteoprotegerin and proliferation of osteoblast.

**Key words:** Osteoblast; Zinc; Osteoprotegerin; Proliferation

基金项目: 国家自然科学基金(30771813); 国家自然基金资助项目(81170808)

作者单位: 110001 沈阳, 中国医科大学附属第一医院骨科(杨茂伟、郭宝磊、曹军军、杨蕾、高志达); 中国人民解放军 95935 部队(梁单); 沈阳市第九人民医院(郭晓东)

通讯作者: 杨茂伟, Email: ymw69@sohu.com

随着人口老龄化,骨质疏松的发病率也逐渐增加。据 IFO(国际骨质疏松协会)统计<sup>[1]</sup>,在全球大约有 2 亿患者,而且这个数字还在不断攀升,在欧洲和美国绝经后妇女骨质疏松的发病率为 30%。国内的流行病学研究发现<sup>[2]</sup>我国的骨质疏松患者大约为 2900 万,并且这个数字还是 5 年前的统计。骨质疏松已成为危害人们生活质量的主要疾病之一,特别是对于老年人群,这种疾病的危害就更为明显。目前,许多人都在探寻骨质疏松发病机制及治疗药物,也取得了一些成果。但由于骨质疏松是个多因素导致的疾病,某些机制还尚未明确,对骨质疏松的治疗也停留在比较初级的阶段。

骨保护素(OPG)是由成骨细胞产生,对于骨代谢的调节具有重要的作用<sup>[3]</sup>。有人将大鼠的骨保护素基因敲除后发现此大鼠出现严重的骨质疏松现象<sup>[4]</sup>。由此可见,OPG 对于骨代谢的调节具有重要的作用。也有许多研究<sup>[5-7]</sup>表明锌是骨形成的重要元素之一,它对于骨代谢有重要的影响,适当浓度的锌可以部分拮抗骨质疏松。我们考虑锌可能通过促进骨保护素的表达来抑制骨质疏松的发生。

我们采用体外培养的成骨细胞,给予不同浓度的锌,观察其对成骨细胞骨保护素基因表达和成骨细胞增殖的影响,对促进和抑制成骨细胞增殖的浓度进行界定,为骨质疏松的治疗提供理论依据和新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

Trizol Reagent(日本 Takara 公司); RT-PCR Kit(日本 Takara 公司);  $\alpha$ -Medium(美国 Invitrogen 公司);大鼠骨保护素引物(北京奥科生物技术有限责任公司);内参(Actin)引物(北京奥科生物技术有限责任公司);DNA Maker(日本 Takara 公司);MTT 试剂(美国 Sigma 公司);胎牛血清(美国 Invitrogen 公司);25cm<sup>2</sup>培养瓶(美国 Costar 公司);硫酸锌(国药集团,中国上海);Elisa 试剂盒(B & D 公司,美国)。

### 1.2 成骨细胞培养

小鼠细胞系 MC3T3-E1 购于中科院上海细胞库,采用含有 10% 的胎牛血清的  $\alpha$ -Medium 培养基进行培养,每 3 天换液 1 次。消化采用含有 0.02% EDTA 的 0.25% 胰酶进行消化。

### 1.3 实验分组和处理

成骨细胞 MC3T3-E1 长到 90% 融合时,传代培养

以  $1 \times 10^5$  个/ml 密度种植于 25cm<sup>2</sup> 培养瓶中,采用随机数字表法分为 A、B、C、D 4 组,每组 6 份,A 组加入 10 $\mu$ mol/L 锌;B 组加入 50 $\mu$ mol/L 锌;C 组加入 200 $\mu$ mol/L 锌;D 组为空白对照组,培养 48h 后进行检测。

### 1.4 成骨细胞骨保护素基因表达

**1.4.1 成骨细胞总 RNA 的提取及分析:**纯化的成骨细胞培养 48h 后,吸去培养液用于测定其中骨保护素含量,Trizol Reagent 提取细胞总 RNA 的步骤如下:培养瓶置于冰上,直接加入 1.5ml Trizol 试剂,反复吹打后将细胞裂解液转移至新的 Eppendorf 管中,室温放置 5min 后加入 200 $\mu$ l 氯仿,剧烈混匀 15s;室温放置 2-3min;4 $^{\circ}$ C 12000r/min,离心 15min;可见分为 3 层,上层水相,中间混合相,下层酚相。吸取水相,转至新的 Eppendorf 管中,约 500 $\mu$ l;加入 500 $\mu$ l 异丙醇,颠倒混匀,室温放置 10min;4 $^{\circ}$ C 12000r/min,离心 10min;吸去液体可见白色沉淀,加入 75% 乙醇 1ml,剧烈混匀;9000r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 5min;吸去液体,真空干燥 5min;溶于 25 $\mu$ l DEPC 处理水中。取少量 RNA,经紫外线扫描,吸收峰位于波长 260nm 处, RNA 纯度 OD260/OD280 在 1.8~2.0 之间。RNA 完整性鉴定采用甲醛琼脂糖电泳方法,用溴化乙锭染色后在紫外线灯下观察,可见 5S、18S 和 28S 三条带,说明 RNA 完整。

**1.4.2 引物合成:**成骨细胞骨保护素(osteoprotegerin)和内参  $\beta$ -actin 引物序列为:osteoprotegerin:上游引物 5'-CCTGGAGATCGA ATTCTGCTTGA-3'下游引物 5'-TTTGCAAACGTG GTTTCGCTCTG-3' $\beta$ -actin:上游引物 5'-GGCCAG GTCATCACTATTG-3'下游引物 5'-GAGGCTTTT ACGGATGTCAAC-3'osteoprotegerin 产物为 93bp 的核苷酸, $\beta$ -actin 产物为 146bp 的核苷酸。

**1.4.3 RT-PCR 反应:**按以下组成配制 20 $\mu$ l RT 反应液:dNTP 1 $\mu$ l, Oligo DT 1 $\mu$ l, RNA, 双蒸水, DTT 1 $\mu$ l, AMW 1 $\mu$ l, 10 $\times$  AMW 反应 buffer 2 $\mu$ l, RNase 抑制物(40U/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l。轻匀,42 $^{\circ}$ C 1h, 70 $^{\circ}$ C 15min。反应后立即进行 PCR 反应。PCR 反应液如下:10 $\times$  PCR 缓冲液 5 $\mu$ l, Taq 0.25 $\mu$ l, dNTP 4 $\mu$ l;骨保护素上游特异性引物(20 $\mu$ mol/L) 1 $\mu$ l, 骨保护素下游特异性引物(20 $\mu$ mol/L) 1 $\mu$ l,  $\beta$ -actin 上游特异性引物 1 $\mu$ l,  $\beta$ -actin 下游特异性引物 1 $\mu$ l, cDNA, dH<sub>2</sub>O。反应条件(30Cycles):94 $^{\circ}$ C 30s; 55 $^{\circ}$ C 30s; 72 $^{\circ}$ C 1min。

**1.4.4 成骨细胞骨保护素 mRNA 表达的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳和观察测定:**PCR 反应结束后,取 10 $\mu$ l 反应液,在含 0.5 $\mu$ g/ml 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶上,恒压 110V 电泳 30min 左右,紫外线下观察并用凝胶成像分析系统做 PCR 产物半定量分析,测量和计算各组目的扩增带与  $\beta$ -actin 吸光度的比值。

**1.5 Elisa 检测细胞培养上清液中骨保护素含量**

成骨细胞培养 48h 后,取上清液,采用骨保护素放免试剂盒检测,根据试剂盒上的说明进行操作,根据标准品曲线测得样品骨保护素的含量。

**1.6 成骨细胞增殖率测定**

成骨细胞接种于 96 孔培养板,每孔 0.1ml,24h 后细胞贴壁,更换培养液,分别加入不同浓度的锌:0 $\mu$ mol/L, 10 $\mu$ mol/L, 30 $\mu$ mol/L, 50 $\mu$ mol/L, 80 $\mu$ mol/L, 100 $\mu$ mol/L, 150 $\mu$ mol/L, 200 $\mu$ mol/L, 250 $\mu$ mol/L。复合培养 24、48h 后。每孔加 MTT10 $\mu$ l, 4h 后,吸净培养液,加入 DMSO150 $\mu$ l,振荡 10min,使结晶充分溶解,酶标仪测量 490nm 波长的吸光度值(OD)。

**1.7 统计学分析**

数据均以均数  $\pm$  标准差表示,采用 SPSS17.0 软件包进行统计学处理,各组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

**2 结果**

**2.1 成骨细胞骨保护素 mRNA 表达结果**

成骨细胞培养 48h 后,骨保护素 PCR 扩增产物电泳分离后紫外灯下观察, A、B、C 和 D 组均出现两条带,骨保护素基因阳性扩增片段为 93bp,  $\beta$ -actin 为 146 bp。A、B、C 和 D 组骨保护素 mRNA 与  $\beta$ -actin 吸光度比值分别为  $0.461 \pm 0.051$ 、 $1.068 \pm 0.123$ 、 $0.244 \pm 0.044$ 、 $0.548 \pm 0.089$ 。A 组较 D 组变化不明显,二者差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。B 组骨保护素 mRNA 表达最高, B 组较 D 组明显升高,二者差异有显著性意义( $P < 0.01$ )。C 组骨保护素 mRNA 的表达最低。二者差异有显著性意义( $P < 0.01$ ),见图 1。

**2.2 成骨细胞培养液中骨保护素含量**

成骨细胞培养 48h 后, A、B、C、D 4 组培养液中骨保护素含量分别为  $3.53 \pm 0.32$ 、 $5.83 \pm 1.07$ 、 $2.06 \pm 0.63$ 、 $3.66 \pm 0.77$ ng/ml。B 组培养上清液中骨保护素含量最高, C 组培养上清液中骨保护素含量最低。A 组较 D 组变化不明显,二者差异无显著

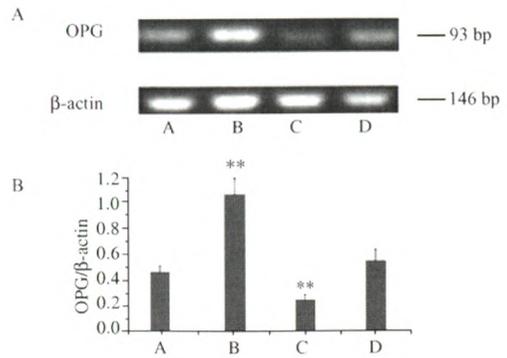


图 1 成骨细胞骨保护素 mRNA 表达

注: A:10 $\mu$ mol/L Zn, B:50 $\mu$ mol/L Zn, C:200 $\mu$ mol/L Zn, D:control

性意义( $P > 0.05$ )。B 组较 D 组明显升高,二者差异有显著性意义( $P < 0.01$ )。C 组较 D 组明显降低,二者差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),见图 2。

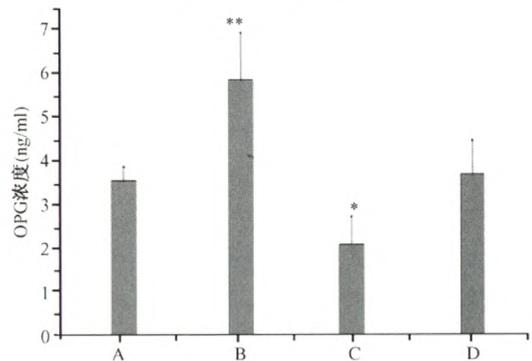


图 2 成骨细胞培养液中骨保护素含量

注: A:10 $\mu$ mol/L Zn, B:50 $\mu$ mol/L Zn, C:200 $\mu$ mol/L Zn, D:control

**2.3 成骨细胞增殖率**

成骨细胞加锌培养 24、48h, A 组(10 $\mu$ mol/L)成骨细胞数目变化不大; B 组(50 $\mu$ mol/L)成骨细胞数目明显增多,密度较大; C 组(200 $\mu$ mol/L)成骨细胞数目较少,密度最小, D 组(0 $\mu$ mol/L)成骨细胞正常生长。A、B、C、D 组成骨细胞增殖率 OD 值 24 和 48h 分别为  $0.579 \pm 0.051$ 、 $0.601 \pm 0.13$ 、 $0.921 \pm 0.114$ 、 $0.942 \pm 0.15$ 、 $0.387 \pm 0.131$ 、 $0.301 \pm 0.088$ 、 $0.521 \pm 0.102$ 、 $0.536 \pm 0.065$ 。C 组细胞增殖率最低, B 组细胞增殖率最高。A 组较 D 组(24 和 48h 组)变化不明显,二者比较差异不明显( $P > 0.05$ )。B 组较 D 组明显升高(24 和 48h 组),二者比较差异有显著性意义( $P < 0.01$ )。C 组较 D 组明显降低(24 和 48h 组),二者比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),见图 3。

**3 讨论**

骨保护素(OPG)为肿瘤坏死因子(TNF)受体家

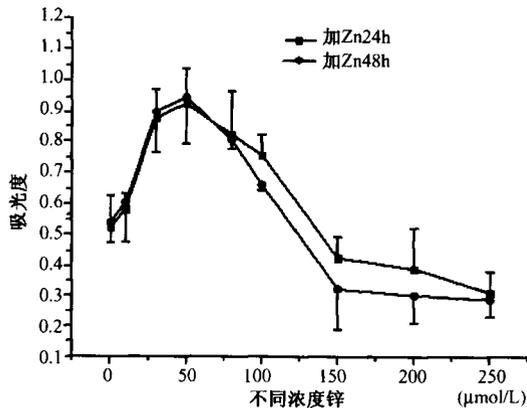


图3 成骨细胞增殖率

族成员,体内大部分组织都能表达 OPG。在骨组织,OPG 由成骨细胞产生,它能够阻断细胞核因子(NF) $\kappa$ B 受体活化因子与配体(RANKL)的结合,抑制破骨细胞成熟分化,阻止骨丢失。OPG 竞争性 RANKL 结合阻止其生物学效应,消除 RANKL 对破骨细胞发生各阶段的支持作用。RANKL/OPG 比例决定了骨的转换状态和净骨量<sup>[8]</sup>。RANKL/OPG 比例失衡可导致骨丢失加快或骨形成增加。有人<sup>[9]</sup>采用基因敲除的办法将小鼠的 OPG 基因敲除,结果发现该鼠发生了严重的骨质疏松。也有人<sup>[10]</sup>研究这类基因敲除小鼠的骨质疏松情况,发现其骨密度、骨小梁数目、骨小梁厚度都明显减低。在本文中,我们将 OPG 做为骨代谢的研究指标,检测影响因素对其作用,以此分析其对骨代谢的影响。由于锌是骨形成的必需因素,所以我们添加了不同浓度的锌,看其对 OPG 表达的影响。

锌是人体必需的微量元素之一,对人体的各种代谢活动起着重要的调节作用,也是骨形成的必需元素,锌在许多蛋白的合成中都发挥了关键的作用<sup>[11]</sup>。我们在以前的研究中发现,大鼠肋生长板软骨细胞缺锌条件下培养,凋亡明显增加<sup>[12]</sup>。也有研究发现锌能够刺激骨形成<sup>[13]</sup>,但锌对骨形成的刺激作用的机制并不明确。有研究认为<sup>[14]</sup>锌可能通过影响碱性磷酸酶的表达来影响骨代谢,也有人认为锌是通过影响胰岛素生长因子来影响骨代谢<sup>[15]</sup>,我们认为锌可能通过影响骨保护素的表达来起作用。图 1 中,50 $\mu$ mol/L 的锌可以显著地增加骨保护素的表达,而 200 $\mu$ mol/L 的锌则对骨保护素的表达起抑制作用。但是低浓度的锌能够促进骨保护素的表达和高浓度的锌抑制增殖抑制骨保护素表达的具体机制尚不是很明确。我们考虑锌可能通过某些促进生长增殖的通路如 MAPK、WNT 等来促进 OPG 的表

万方数据

达。而高浓度的锌可能会导致细胞内离子平衡障碍,或者高锌能够抑制某些细胞生长所必须的酶类。还有很多未知的领域值得今后进一步研究。

骨质疏松对人类的健康影响越来越大,至今也没有一种良好疗效的药物。骨质疏松是一种多因素的疾病,对它的研究也还停留在很肤浅的阶段。通过我们的研究,我们发现低浓度的锌对骨生长有很好的促进作用,这也为骨质疏松的治疗开辟了新的思路,在今后的研究中我们会进一步深入探讨机制,为人类的健康做出贡献。

### 【参 考 文 献】

- [1] Cole ZA, Dennison EM, Cooper C. Osteoporosis epidemiology update. *Curr Rheumatol Rep*, 2008, 10:92-96.
- [2] 薛延. 骨质疏松症的现状、流行趋势与研究方向. *中国全科医学*, 2005, 16:1299-1300.
- [3] Zhang J, Dai J, Qi Y, et al. Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *J Clin Invest*, 2001, 107:1235-1244.
- [4] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*, 1998, 12:1260-1268.
- [5] Masayoshi Yamaguchi. Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis. *Mol Cell Biochem*, 2010, 338:241-254.
- [6] Hyun-Ju Seo, Young-Eun Cho, Taewan Kim, et al. Zinc may increase bone formation through stimulating cell proliferation, alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Nutrition Research and Practice*, 2010, 4:356-361.
- [7] Otsuka M, Oshinbe A, Legeros RZ, et al. Efficacy of the injectable calcium phosphate ceramics suspensions containing magnesium, zinc and fluoride on the bone mineral deficiency in ovariectomized rats. *J Pharm Sci*, 2008, 97:421-432.
- [8] Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*, 2006, 12: 17-25.
- [9] XU Yong, YANG Hua, QIAO Jian-Ou, et al. High-bone-turnover Osteoporosis and Aortic Calcification in Opg Knockout Mice *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2007, 34: 260-266.
- [10] 程少丹, 王拥军, 唐德志, 等. OPG 基因敲除小鼠骨质疏松情况的研究. *中国骨质疏松杂志*, 2008, 14:16-19.
- [11] Kishi S, Segawa Y, Yamaguchi M. Histomorphological confirmation of the preventive effect of beta-alanyl-L-histidinato zinc on bone loss in ovariectomized rats. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17:862-865.
- [12] 初立伟, 杨茂伟, 于江, 等. 缺锌对增殖期大鼠生长板软骨细胞凋亡的影响. *中国医科大学学报*, 2009, 38:827-830.
- [13] Lutz W, Burritt MF, Nixon DE, et al. Zinc increases the activity of vitamin D-dependent promoters in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 271:1-7.
- [14] Hall SL, Dimai HP, Farley JR. Effects of zinc on human skeletal alkaline phosphatase activity in vitro. *Calcif Tissue Int*, 1999, 64:163-172.
- [15] Yamaguchi M, Fukagawa M. Role of zinc in regulation of protein tyrosine phosphatase activity in osteoblastic MC3T3-E1 cells; zinc modulation of insulin-like growth factor-I's effect. *Calcif Tissue Int*, 2005, 76:32-38.

(收稿日期: 2011-05-27)

# 不同浓度锌对成骨细胞MC3T3-E1骨保护素基因表达和细胞增殖的影响



作者: [杨茂伟](#), [梁单](#), [郭宝磊](#), [曹军军](#), [杨蕾](#), [郭晓东](#), [高志达](#)  
作者单位: [杨茂伟, 郭宝磊, 曹军军, 杨蕾, 高志达 \(中国医科大学附属第一医院骨科, 沈阳, 110001\)](#), [梁单 \(中国人民解放军95935部队\)](#), [郭晓东 \(沈阳市第九人民医院\)](#)  
刊名: [中国骨质疏松杂志](#)   
英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)  
年, 卷(期): 2011, 17 (12)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zggzsszz201112001.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201112001.aspx)