

· 论 著 ·

糖基化终产物对成骨细胞 I 型胶原积聚的影响

蔡若男 金晖 张丽娟

中图分类号: R589.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)12-1065-04

摘要: **目的** 探讨糖基化终产物(AGEs)对成骨细胞与破骨前体细胞共培养体系中 I 型胶原合成与降解的影响。**方法** 在成骨细胞与破骨前体细胞共培养体系中分别加入不同浓度的糖基化终产物(50、100、200、400mg/L)干预 24h,以无血清培养基和相应浓度的牛血清白蛋白为对照。用免疫印迹的方法检测 I 型胶原蛋白水平的表达,酶联免疫吸附法检测上清中 I 型胶原的含量,用明胶酶谱法检测上清中 MMP-2、MMP-9 的活性。**结果** AGEs 干预组的 I 型胶原蛋白水平和上清中含量与对照组比较有显著差异, I 型胶原蛋白水平随浓度增加而增加($P < 0.05$),上清中 I 型胶原含量随 AGEs 浓度增加而减少($P < 0.05$)。糖基化终产物干预后,上清中 MMP-2、MMP-9 的活性随着 AGEs 浓度的增加而增加($P < 0.05$)。**结论** AGEs 可能通过打破 I 型胶原合成与降解之间的平衡,使其降解多于合成, I 型胶原总量减少,从而参与骨质疏松的发病,使骨骼脆性增加。

关键词: 糖基化终产物; I 型胶原; 骨质疏松

The effect of advanced glycation end products on the accumulation of type I collagen CAI Ruonan, JIN Hui, ZHANG Lijuan. Department of Endocrinology, The Affiliated Zhongda Hospital of Dong Nan University, Nanjing 210009, China

Corresponding author: JIN Hui, Email: jinhuisun@126.com

Abstract: **Objective** To explore the effect of advanced glycation end products (AGEs) on the synthesis and degradation of type I collagen in a co-cultured system of osteoblast and osteoclast precursors. **Methods** The AGEs of 50, 100, 200, and 400 mg/L different concentrations were respectively added into the co-cultured system of osteoblast and osteoclast precursors for 24 hours. The serum free medium and bovine serum albumin (BSA) were considered as negative control. The expression of type I collagen protein was measured using Western blotting method. The concentration of type I collagen in the supernatant was measured using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The activity of MMP-9 and MMP-2 were measured using gelatin enzymogram. **Results** The expression of type I collagen protein and concentration of type I collagen in the supernatant in AGEs group were significantly different with those of DMEM and BSA groups. The level of type I collagen protein expression increased with the increase of AGEs concentration. However, type I collagen in the supernatant decreased with the increase of AGEs concentration ($P < 0.05$). The activities of MMP-9 and MMP-2 increased with the increase of AGEs concentration ($P < 0.05$). **Conclusion** AGE-BSA may break the balance between the synthesis and the degradation of type I collagen, resulting in degradation excess synthesis. The content of type I collagen decreases, leading to the occurrence of osteoporosis and the increase of bone fragility.

Key words: Advanced glycation end products; Type I collagen; Osteoporosis

骨质疏松(osteoporosis, OP)是一种以骨强度降低,骨折危险性增加为特征的骨骼代谢疾病。骨强度反应的是骨密度与骨质量的总和,而骨组织中 I 型胶原代谢异常会严重影响骨强度,增加骨质疏

松性骨折风险。有研究发现骨质疏松患者组织中有大量的糖基化终产物积聚(AGEs)^[1], AGEs 的积聚可引起皮质骨和小梁骨机械特性的降低^[2],使骨脆性增加,骨折的危险性增加。胶原分子是一种长寿蛋白,极易被糖基化终产物修饰。所以糖基化终产物可能参加了年龄相关的骨强度降低,本文通过用体外制备的 AGE-牛血清白蛋白(AGE-BSA)干预成

作者单位: 210009 南京,东南大学附属中大医院内分泌科

通信作者: 金晖, Email: jinhuisun@126.com

骨细胞与破骨前体细胞共培养体系,检测 I 型胶原合成与降解指标的变化,探讨 AGEs 在骨质疏松尤其是骨质疏松性骨折发病过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

牛血清白蛋白(BSA, AMRESCO 产品); α -MEM 培养基(Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);小鼠 I 型胶原试剂盒(R&D 公司);其他试剂均为国产分析纯。AGE-BSA 的制备:BSA 的浓度为 5g/L,葡萄糖的浓度为 50mmol/L,充分溶解于 pH7.4 的 PBS 后,过滤除菌,37℃ 无菌避光孵育 90d。PBS 溶液透析出去未结合的葡萄糖。不含葡萄糖的 BSA 作为阴性对照。荧光光谱扫描分析(激发波长 370nm,发射波长 440nm,狭缝 3nm)鉴定 AGE。

1.2 细胞培养及干预

小鼠成骨样细胞(MC3T3E1)及小鼠巨噬细胞(RAW264.7)购买于中国科学院上海生命科学研究院。用含 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养液,置 37℃,5% CO₂ 培养箱培养。将处于对数生长期的细胞分别按 1:3 移入 6 孔板中,RAW264.7 细胞移入预先放入 Transwell 小室的 6 孔板内,待细胞生长至 80%~90% 融合状态时,将接种有 RAW264.7 的 Transwell 小室移入接种 MC3T3E1 的 6 孔板中,换用无血清的培养液同步化饥饿 24h 后,分别加入不同浓度的 AGE-BSA(0、50、100、200、400mg/L)干预共培养的细胞,不含葡萄糖 BSA(浓度为 400mg/L)最为对照,每组 3 个复孔,24h 后收集细胞及上清。

1.3 Westernblot 法检测成骨细胞 I 型胶原蛋白的表达

裂解 MC3T3E1 提取总蛋白,以 Bradford 法检测总蛋白浓度。在 10% SDS-PAGE 分离胶上覆盖 5% 的浓缩胶,将样本用裂解缓冲液稀释相同浓度,与等量上样缓冲液混合,取蛋白量为 70 μ g,95℃ 5min 冰上冷却后上样。电泳后将凝胶一次进行湿电转移、5% 脱脂牛奶室温封闭 1h,一抗 4℃ 孵育过夜、二抗室温孵育 1h,显影液显影,X 光胶片曝光。

1.4 ELISA 法检测上清中 I 型胶原的含量

参照 ELISA 试剂盒说明书操作。

1.5 明胶酶谱法测定细胞培养上清中 MMP-2、MMP-9 活性

取培养细胞上清与 4x 上样缓冲液(10% SDS 1g,4% 蔗糖 0.4g,0.1% 溴酚蓝 0.01g,0.25mol/L Tris-HCl)按 1:3 混匀,上样后低温 100V 电泳约

2.5h。将胶浸泡于 2.5% Triton X-100 中温和震荡洗涤 1h,每 15min 更换一次洗涤液,再浸泡于孵育缓冲液中(50mmol/L Tris-HCl,5mmol/L CaCl₂,0.2mol/L NaCl,0.02% Brij-35,pH 7.6)37℃ 孵育 18h,考马斯亮蓝染色,脱色液脱色,蓝色背景上出现 MMP 透亮带。经图像分析系统 BandScan 读取条带面积和酶解条带灰度,酶含量 = 条带面积 $\times$ (条带灰度 - 背景灰度)。

1.6 统计学处理

计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 软件分析数据,组间差异用方差分析进行统计学检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 不同浓度 AGEs 对 I 型胶原蛋白表达的影响

结果显示 MC3T3E1 细胞中有 I 型胶原蛋白的表达。不同浓度 AGE-BSA(0、50、100、200、400mg/L)干预 MC3T3E1 后 I 型胶原蛋白表达呈剂量依赖方式增加。I 型胶原蛋白/ β -actin (0.2440 ± 0.05657 vs 0.6200 ± 0.06647 vs 0.4200 ± 0.02546 vs 0.59990 ± 0.07778 vs 0.7775 ± 0.09546 vs 1.1045 ± 0.04596 , $P < 0.05$,如图 1)。

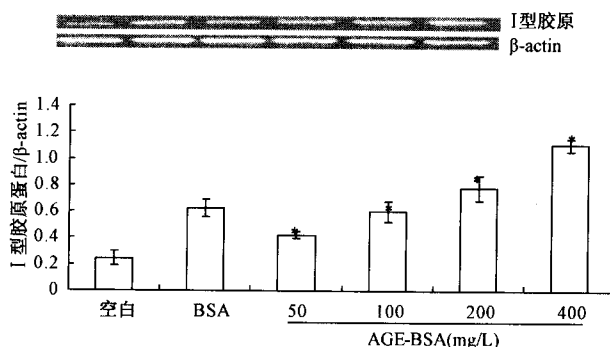


图 1 不同浓度 AGEs 对 I 型胶原蛋白表达的影响 ($P < 0.005$)

2.2 不同浓度 AGEs 对共培养上清中 I 型胶原含量的影响

基础状态下 MC3T3E1 即分泌 I 型胶原 (μ g/L) 为 25.30 ± 0.4108 , 分别用浓度为 50、100、200、400mg/L 的 AGE-BSA 干预后,发现 AGE-BSA 在浓度为 50mg/L 时 I 型胶原含量即已减少,并随 AGE-BSA 浓度的增高进一步减少。AGE-BSA 各浓度点 I 型胶原含量均低于对应 BSA 组 ($P < 0.05$)。AGE-BSA 各浓度点 I 型胶原含量 (μ g/L) 分别是 (AGE-BSA vs BSA) 50mg/L: 21.3145 ± 0.3081 vs 25.3100

± 0.30811 ; 100mg/L : 20.37704 ± 0.1541 vs 25.2176 ± 0.0770 ; 200mg/L : 19.3537 ± 0.2054 vs 25.2542 ± 0.7703 ; 400mg/L : 18.1373 ± 0.3851 vs 25.4357 ± 0.1284 (图 2)。

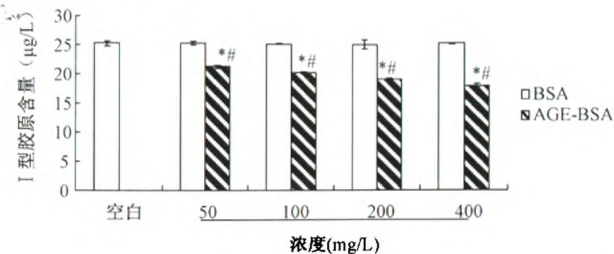


图 2 不同浓度 AGEs 对共培养上清中 I 型胶原含量的影响
注:与空白组比较, * $P < 0.05$, 与 BSA 相比, # $P < 0.05$

2.3 不同浓度 AGEs 对共培养上清中 MMP-2、MMP-9 活性的影响

基础状态下即分泌 MMP-2、MMP-9, 其条带的酶解量为 ($\text{INT}\cdot\text{mm}^2$) 分别为 41.47 ± 8.2778 , 211.26 ± 1.6696 , 分别用浓度为 50 、 100 、 200 、 400mg/L 的 AGE-BSA 干预后, 发现 MMP-2 及 MMP-9 的酶解量随 AGE-BSA 浓度的增高而增加。BSA 对照组 MMP-2 及 MMP-9 酶解量分别为 5.87 ± 1.4714 、 144.70 ± 12.8477 。各浓度点 MMP-2 酶解量依次为 75.34 ± 0.9364 、 117.58 ± 7.9536 、 138.71 ± 3.4963 、 158.32 ± 5.9569 ; 各浓度点 MMP-9 的酶解量依次为 451.25 ± 18.8466 、 578.86 ± 59.2758 、 667.01 ± 19.1219 、 751.13 ± 22.5777 (见图 3)。

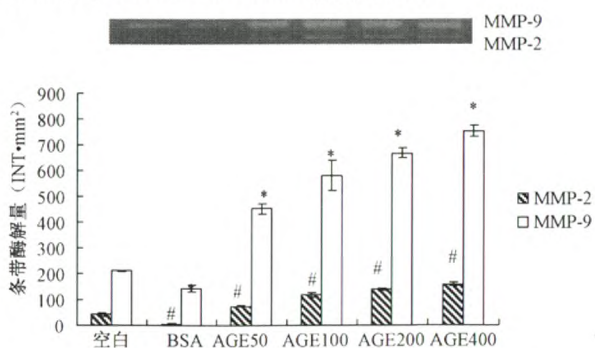


图 3 不同浓度 AGEs 对共培养上清中 MMP-2、MMP-9 活性的影响

注:与空白对照相比, * $P < 0.05$, 与 BSA 组相比, # $P < 0.05$

3 讨论

随着我国人口的老龄化,骨质疏松已成为严重的公共健康问题。随着研究的深入,骨强度的概念逐渐受到重视, I 型胶原是骨有机质的主要组成成分,

I 型胶原的转换主要是受体力活动、胶原的合成及降解所支配^[3], 其代谢异常可引起骨强度降低, 骨折危险性增加, 且有研究显示正常人和骨质疏松患者胶原纤维中的羟磷灰石体积无明显差异, 而在成骨不全患者中 I 型胶原的三链螺旋结构受到破坏, I 型胶原翻译后过度修饰, 且胞外分泌明显减少^[4]。骨组织中的胶原蛋白是一种长寿蛋白, 极易发生非酶糖基化。故启发我们研究 AGEs 是否通过影响 I 型胶原的代谢而参与骨质疏松的发生与发展。

骨重建主要由成骨细胞和破骨细胞共同完成, 在体内, 这两种细胞相互偶联, 相互影响。大量的研究已经证实成骨细胞可通过 RANK/RANKL/OPG 途径影响破骨细胞的分化。而 Kubota^[5]等首先报道了破骨细胞也可直接作用于成骨细胞。朱梅等^[6,7]研究发现破骨细胞样细胞及其细胞器可显著增加成骨细胞骨钙素、碱性磷酸酶活性及核结合因子 Cbfa1 基因与蛋白质水平的表达, 参与成骨细胞的分化和成熟, 并激活成骨细胞的特异基因如骨涎蛋白 (BSP)、骨桥素 (OPN) 和 I 型胶原等。因此我们选择了成骨细胞与破骨前体细胞共培养的模式, 更好的模拟体内的微环境。本研究发现, AGEs 干预后, 成骨细胞 I 型胶原的合成增加, 可能是由于在共培养环境下 AGEs 可使破骨前体细胞活性增加, 破骨前体细胞分泌细胞因子增加, 从而使成骨细胞活性增加, I 型胶原的合成增加, 但上清中 I 型胶原的含量减少, 两者之间似乎不相符合, 我们推论除了 I 型胶原的分泌减少外, I 型胶原的降解增多也可能是引起上清中含量减少的原因, 因此我们进一步研究了 AGEs 干预后基质金属蛋白酶 (MMPs) 的变化。

MMPs 是一种能水解多种细胞外基质的锌离子依赖的蛋白酶, 常以酶原的形式存在, 经不同途径激活后参与细胞外基质的降解。研究表明骨组织中存在多种 MMPs, 其中 MMP-9 主要由破骨细胞合成和分泌, MMP-2 主要由成骨细胞合成和分泌。有研究表明, 绝经后妇女血清中 MMP-2、MMP-9 水平随骨密度的降低呈现升高趋势^[8], 我们的研究结果也显示 MMP-2、MMP-9 的水平随 AGEs 的浓度增加呈剂量依赖性增加, 说明在糖基化终产物干预下, I 型胶原的降解活跃。因此, 我们推论 AGEs 干预后, I 型胶原的降解与合成之间的平衡被打破, 降解多于合成, 在整体水平中 I 型胶原的含量减少, 从而使矿物

(下转第 1072 页)

高其健康水平及生活质量。

【参 考 文 献】

- [1] Schulz E, Arfai K, Liu XD, et al. Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(9): 4246-4253.
- [2] 郭继鸿, 张萍. 动态心电图. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 630.
- [3] Agaston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, et al. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J AM Coll Cardiol*, 1990, 15(4): 827-832.
- [4] Laroth M. Atherosclerosis and osteoporosis. *Press Med*, 1996, 25(2): 52-54.
- [5] Laroche M, Pouilles JM, Ribot C, et al. Comparison of the bone mineral content of the lower limbs in men with ischaemic arteriosclerotic disease. *Clin Rheumatol*, 1994, 23(4): 611-614.
- [6] Watson DC, Abrolt XR. Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification. *Circulation*, 1997, 96: 1755-1760.
- [7] Shemesh J, Koren Morag N, Apter S, et al. Accelerated progression of coronary calcification: four year follow up in patients with stable coronary artery disease. *Radiology*, 2004, 233(1): 201-209.
- [8] Russell Ross. The pathogenesis of arteriosclerosis. *Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine*. Harcourt Asia. W. B. Saunders, 1999: 1105-1106.
- [9] Tintut Y, Morony S, Demer L L. Hyperlipidemia promotes osteoclastic potential of bone marrow cells ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(2): 6-10.
- [10] Ganant HK, Engelke K, Fuerst T, et al. Noninvasive assessment of bone mineral and structure: state of the art. *Bone Miner Res*, 1996, 11: 707-730.
- [11] Farhad P, Alan G, Linda LD. Role of lipids in osteoporosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20: 346-348.
- [12] Kang S, Bennett CN, Gerin I, et al. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer binding protein α and peroxisome proliferator activated receptor. *J Bio Chem*, 2000, 282(19): 14515-14524.
- [13] Sammartino A, Cirillo D, Mandato VD, et al. Osteoporosis and cardiovascular disease: benefit risk of hormone replacement therapy. *J Endocrinol Invest*, 2005, 28(10): 80-84.

(收稿日期: 2011-08-02)

(上接第 1067 页)

质失去依附, 溶解增多, 进而参与骨质疏松的发生发展。

【参 考 文 献】

- [1] Hein G, C Weiss, G Lehmann, et al. Advanced glycation end product modification of bone proteins and bone remodeling: hypothesis and preliminary immunohistochemical findings. *Ann Rheum Dis*, 2006, 65: 101-104.
- [2] Hernandez CJ, Tang SY, Baumbach BM, et al. Trabecular microfracture and the influence of pyridinium and non-enzymatic glycation-mediated collagen cross-links. *Bone*, 2005, 37: 825-832.
- [3] Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiological Reviews*, 2004, 84: 649-698.
- [4] Pace JM, Atkinson M, Willing MC, et al. Deletions and duplications of Gly-Xaa-Yaa triplet repeats in the triple helical domains of type I collagen chains disrupt helix formation and result in several types of osteogenesis imperfecta. *Human Mutation*, 2001, 18: 319-326.
- [5] Kubota K, Sakikawa C, Katsumata M, et al. Platelet-derived growth factor BB secreted from osteoclasts acts as an osteoblastogenesis inhibitory factor. *J Bone Miner Res*, 2002, 17: 257-265.
- [6] 朱梅, 帐篷, 张鑫, 等. 骨片上培养的破骨细胞样细胞及其细胞器对成骨细胞培养的实验研究. *中华医学杂志*, 2005, 85(11): 738-742.
- [7] 朱梅, 李雨民, 邱明才, 等. 破骨细胞样细胞及其亚细胞成分对成骨细胞 Cbfa1 表达的影响. *中华内分泌代谢杂志*, 2005, 21(2): 159-162.
- [8] 秦健, 王志辉, 毕仕强. 绝经后妇女血清基质金属蛋白酶-2、-9 与骨转换生化指标及骨密度的关系. *中国骨质疏松杂志*, 2009, 15(4): 292-295.

(收稿日期: 2011-07-22)

糖基化终产物对成骨细胞I型胶原积聚的影响

作者: [蔡若男](#), [金晖](#), [张丽娟](#), [CAI Ruonan](#), [JIN Hui](#), [ZHANG Lijuan](#)
作者单位: [东南大学附属中大医院内分泌科, 南京, 210009](#)
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_zggzsszz201112008.aspx