

β₂ 肾上腺素能受体激动剂/拮抗剂对大鼠 OB IGF-I 受体 mRNA 表达的影响

彭莉¹ 李双庆^{2*}

1. 上海市浦东新区公利医院内分泌科, 上海 200135
2. 四川大学华西金卡医院, 成都 610041

中图分类号: R589.9 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 05-0490-05

摘要: **目的** 通过研究 β₂ 肾上腺素能受体 (ADRβ₂R) 激动剂/拮抗剂对大鼠成骨细胞 (OB) 成骨性指标胰岛素样生长因子-I 受体 (IGF-I R) mRNA 表达的调控作用, 探讨交感神经系统 (SNS) 对骨代谢影响的分子机制。 **方法** 取 24 h 内出生的新生 SD 大鼠的颅盖骨 OB 进行体外培养, 通过细胞形态学观察、碱性磷酸酶重氮盐法染色和矿化结节茜素红 S 染色法来鉴定 OB。将传至第三代的 OB 分成 A 组 (ADRβ₂R 激动剂)、B 组 (ADRβ₂R 拮抗剂) 和 C 组 (对照组), 分别用不同浓度的 ADRβ₂R 激动剂 (salbutamol) 或 ADRβ₂R 拮抗剂 (ICI-118551) 对 OB 处理 24 h、72 h 和 96 h, 检测 IGF-I R mRNA 的表达变化, 观察时间效应和剂量效应的关系。 **结果** ADRβ₂R 拮抗剂 ICI-118551 可以上调 OB 上 IGF-I R mRNA 的表达; 而 ADRβ₂R 激动剂 salbutamol 则下调 IGF-I R mRNA 的表达。两种调节作用均具有时间剂量依赖性。 **说明** β₂ 肾上腺素能受体 (ADRβ₂R) 激动剂/拮抗剂可以通过作用于 SD 大鼠 OB 上的 ADRβ₂R 而影响 OB 的骨形成指标 IGF-I R mRNA 的表达, 间接影响了骨形成因子 IGF-I 的促进骨形成能力, 从而调节骨代谢。

关键词: β₂ 肾上腺素能受体激动剂; β₂ 肾上腺素能受体拮抗剂; 成骨细胞; IGF-I R

The effect of β₂adrenergic agonist/antagonist on the mRNA expression of IGF-I receptor in rat osteoblasts

PENG Li¹, LI Shuangqing²

1. Department of Endocrinology, Shanghai Pudong New Area Gongli Hospital
2. West China Jinka Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: LI Shuangqing, Email: lishuangqing@sina.com

Abstract: **Objective** By study of the effect of β₂ adrenergic receptor (ADRβ₂R) agonist/antagonist on the mRNA expression of insulin-like growth factor type I receptor (IGF-I R) in cultured rat osteoblasts (OB) *in vitro*, to explore the molecular mechanism of the effect of the sympathetic nervous system (SNS) on bone metabolism. **Methods** Osteoblasts were isolated from the neonatal cranium of SD rats younger than 24 hours and passage cultured *in vitro*. The osteoblasts were identified using cytomorphology, ALP staining, and the Alizatin Bordeaux staining of mineralized nodules. The 3rd passage of osteoblasts were divided into 3 groups: A (ADRβ₂R agonist group), B (ADRβ₂R antagonist group), and C (normal control group, NC). Cells in group A and group B were treated with different concentrations of ADR β₂R agonist (salbutamol) or ADRβ₂R antagonist (ICI-118551). After culturing for 24 hours, 72 hours, and 96 hours, the mRNA expression of IGF-I R was detected. The relationship between time- and dose-dependent efficiency was observed. **Results** ADRβ₂R antagonist ICI-118551 could up-regulate the mRNA expression of IGF-I R, while ADRβ₂R agonist salbutamol down-regulated the mRNA expression of IGF-I R. Both regulations showed time- and dose-dependent efficiency. **Conclusion** ADRβ₂R agonist/antagonist can regulate the mRNA expression of IGF-I R through ADRβ₂R in rat OBs, thus indirectly influencing the ability of IGF-I in promoting bone formation and regulating bone metabolism.

Key words: ADRβ₂R antagonist; ADRβ₂R agonist; Osteoblast; IGF-I R

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 基本病理生理机制是成骨细胞 (osteoblast, OB) 的形成、分化和功能

*通讯作者: 李双庆, Email: lishuangqing@sina.com

降低,使骨重建时破骨细胞(osteoclast, OC)介导的骨吸收作用超过了 OB 介导的骨形成作用。研究发现,骨量的调控不仅取决于激素水平、营养状态、物理因素、免疫功能和遗传基因,交感神经系统(sympathetic nerve system, SNS)也可对骨量调控发挥重要的作用。Pasco 等^[1]在对 569 例发生意外骨折的女性患者使用 β 肾上腺素能受体拮抗剂,发现其能增加骨密度,降低骨折的危险性。Levasseur 等^[2]发现悬吊大鼠喂食普萘洛尔后大鼠股骨远侧干骺端骨密度较未悬吊组及安慰剂组高。李艳玲等^[3]也发现普萘洛尔能使卵巢切除术后骨质疏松大鼠的骨量增加,抑制骨丢失,促进骨形成,对绝经后骨质疏松有明显的防治作用。SNS 广泛分布于外周组织器官,研究发现 OB 和骨小梁附近有交感神经纤维存在。研究发现 OB 和 OC 上都具有 β_2 肾上腺素能受体(β_2 adrenoreceptors, $\text{ADR}\beta_2\text{R}$)。刺激 OB 的 $\text{ADR}\beta_2\text{R}$ 能下调 OB 分化,降低核心结合因子 a_1 (Cbfa1) 的表达^[4]。Takeuchi 等^[5]发现激动 $\text{ADR}\beta_2\text{R}$,能增加骨保护素配体(RANKL)表达,从而促进 OC 形成、分化、成熟,导致骨吸收增强,抑制骨形成,而普萘洛尔能抑制 RANKL 基因表达,增加 OB 的数量及骨量。

目前多数治疗 OP 的药物主要是抑制骨吸收,并不促进骨形成,因此,难以促进骨质疏松患者的骨再生。胰岛素样生长因子-I (insulin-like growth factor-I, IGF-I) 是骨生成的强刺激因子,它能促进 OB 前体向 OB 分化、成熟,促进 OB 增殖,加速骨胶原合成及骨基质矿化、沉积,促进骨碱性磷酸酶(bALP)、骨钙素、I 型胶原等成骨标志物的表达,抑制 OB 调亡和骨基质的降解。目前被认为是极具发展前景的治疗骨质疏松新型药物^[6,7]。IGF-I 存在内分泌、旁分泌、自分泌三种作用形式,IGF-I 通过与 IGF-I 受体 (insulin-like growth factor type I receptor, IGF-I R) 结合而发挥了对骨代谢的影响作用。 $\text{ADR}\beta_2\text{R}$ 激动剂或抑制剂能否调节 OB 上的 IGF-I R mRNA 的表达, SNS 会对 IGF-I R 这一在骨代谢中发挥重要生理作用的受体有什么影响? 本研究拟观察 $\text{ADR}\beta_2\text{R}$ 激动剂/抑制剂作用于 OB 后对 IGF-I R mRNA 表达的影响,探讨 SNS 对骨代谢的调节机制,为骨质疏松的防治提供新的途径。

1 材料和方法

1.1 研究对象

由新生(24 h)SD 大鼠颅盖骨分离得到的成骨

细胞(OB)。

1.2 实验方法

1.2.1 提取、分离、培养 OB:将 10 只出生 24 h 内的 SD 大鼠浸泡于 75% 乙醇,取出后于无菌条件下处理,将颅骨片剪成小骨片,加入胰蛋白酶消化。用含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM-HG 培养基清洗数次。将骨片放入培养瓶中做翻转培养。标记细胞类型、日期和代数。置于 37 °C、饱和湿度、5% CO_2 孵箱中培养,3 天后再观察细胞贴壁情况,待细胞从骨片周边呈放射状长出后,换液,并弃去骨片,以后常规每 3 天全量换液 1 次。细胞融合至 80% ~ 90% 时,按 1:2 ~ 3 常规消化传代。培养细胞再度融合时,依次传代。

1.2.2 取第 3 代 OB 做成骨细胞鉴定:采用细胞碱性磷酸酶重氮盐法染色及矿化结节茜素红 S 染色对培养细胞进行鉴定。

1.2.3 $\text{ADR}\beta_2\text{R}$ 激动剂/拮抗剂对大鼠 OB IGF-I R mRNA 表达的影响

取第三代 OB 接种于 6 孔培养板和 96 孔培养板中继续培养,将 OB 随机分成 3 组,分别加入 $\text{ADR}\beta_2\text{R}$ 激动剂或拮抗剂进行干预,再按药物浓度的不同分为:1 $\mu\text{mol/L}$ 组,10 $\mu\text{mol/L}$ 组,100 $\mu\text{mol/L}$ 组,并设置对照组。干预培养后第 24 小时、72 小时、96 小时分别收集细胞,提取 RNA,荧光定量 PCR 测定 OB 上 IGF-I R mRNA 的表达情况。

1.3 统计分析

采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析。Excel 软件作图表。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示(取小数点后两位数字),多组之间均数比较使用方差分析,如方差齐,两两比较用 LSD 法;如方差不齐,两两比较用 Tamhane's T_2 法。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 OB 的培养

倒置相差显微镜下观察第 3 代传代细胞形态:细胞呈多角形、长棱形、不规则形,有较多突起,胞核明显,呈卵圆形,可见 1 ~ 3 个核仁,胞质透亮、饱满。

2.2 OB 的鉴定

2.2.1 细胞碱性磷酸酶重氮盐法染色:结果为细胞质中出现红色或红棕色颗粒。

2.2.2 矿化结节茜素红 S 染色:OB 经过 20 d 的矿化培养,倒置相差显微镜下观察培养的细胞爬片上有不透光的矿化结节出现。茜素红 S 染液染色后可见钙结节染成红色。

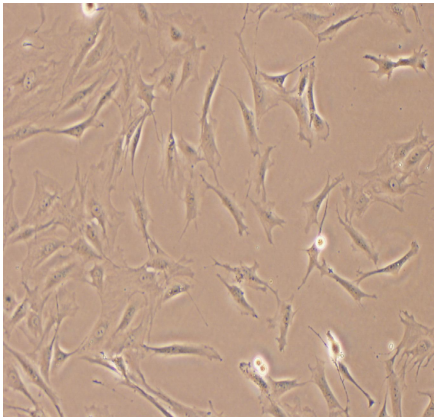


图 1 原代培养的鼠成骨细胞(×100)
Fig. 1 The primary culture of rat OBs (×100)

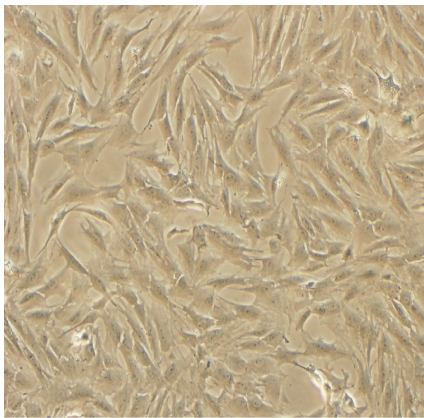


图 2 传代培养的鼠成骨细胞(×100)
Fig. 2 The passage culture of rat OBs (×100)

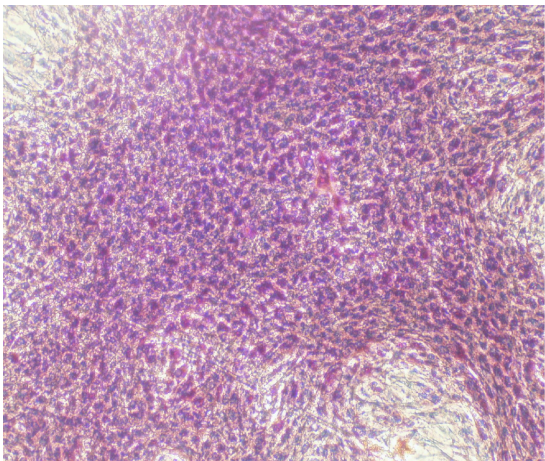


图 3 OB 碱性磷酸酶重氮盐法染色
Fig. 3 The alkaline phosphatase diazonium salt staining of OBs.

2. 2. 3 ADRβ₂R 激动剂/拮抗剂对新生 SD 大鼠 OB 上 IGF-I R mRNA 表达的影响

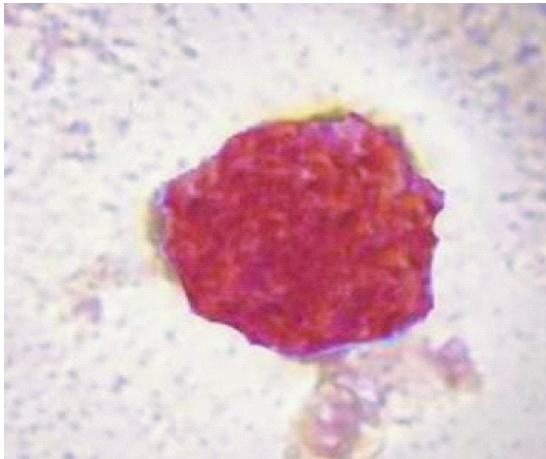


图 4 矿化结节茜素红 S 染色
Fig. 4 The Alizarin red S staining of mineralized nodules.

表 1 各组细胞 IGF-I R mRNA 相对表达量的比较
Table 1 Comparison of the relative expression of IGF-I R mRNA among groups.

组别	浓度 (μmol/L)	24 h (u/g prot)	72 h (u/g prot)	96 h (u/g prot)
对照组		1. 61 ± 0. 34	1. 61 ± 0. 34	2. 28 ± 0. 48
salbutamol	1	1. 61 ± 0. 34	1. 61 ± 0. 34	2. 00 ± 0. 00
	10	1. 14 ± 0. 24	1. 00 ± 0. 00	0. 90 ± 0. 17
	100	1. 14 ± 0. 24	0. 90 ± 0. 17	0. 83 ± 0. 29
ICI-118551	1	1. 61 ± 0. 34	1. 80 ± 0. 34	2. 55 ± 0. 48
	10	2. 00 ± 0. 00	2. 28 ± 0. 48	3. 61 ± 0. 68
	100	2. 00 ± 0. 00	2. 55 ± 0. 48	4. 16 ± 1. 42

(1)IGF-I R mRNA 表达随时间的变化趋势:

同一药物浓度条件下,salbutamol 组 IGF-I R mRNA 表达量较对照组减少,随时间延长,减少程度越大,96 h 时表达量最低;与对照组相比,ICI-118551 组 IGF-I R mRNA 表达量逐渐增加,且随时间延长增加程度越大,96 h 时表达量较高。其中 0 ~24 h 时间段各实验组变化幅度较小,24 ~72 h 时间段各实验组变化幅度最明显,72 ~96 h 时间段变化幅度较 24 ~72 h 时间段有所下降。但 ICI-118551 组 IGF-I R mRNA 表达量在 96h 时增高明显。

(2)IGF-I R mRNA 表达量随药物剂量的变化趋势

随药物浓度增加,salbutamol 组 IGF-I R mRNA 表达逐渐下调,且药物浓度越大,下调幅度越大;ICI-118551 组随药物浓度增加 IGF-I R mRNA 表达逐渐上调,且药物浓度越大,增加的幅度越大。在各个时间点,药物浓度越大变化越明显,以 100 μmol/L 浓度组变化最明显。

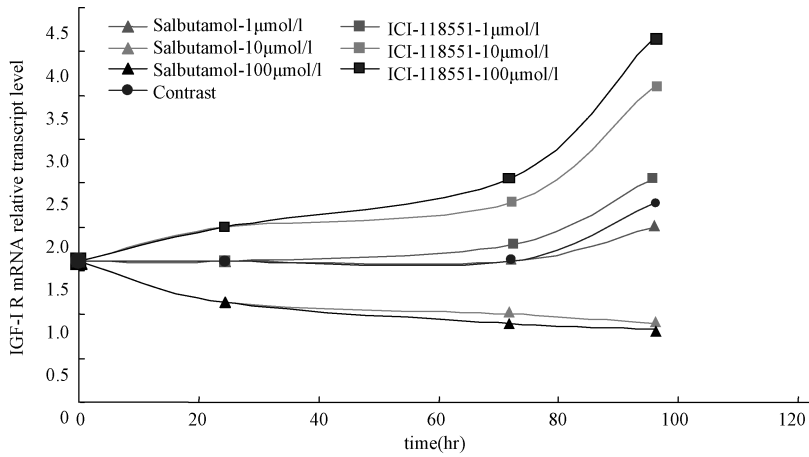


图 5 各组细胞 IGF-I R mRNA 相对表达量随时间、药物浓度的变化趋势

Fig. 5 The changing trend of the relative expression of IGF-I R mRNA along with the changes of time and drug concentration in each group

与同一时间点对照组相比, 10 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 salbutamol 组和 ICI-118551 组 IGF-I R mRNA 表达量的变化在 72 ~ 96 h 时具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

胰岛素样生长因子-I (insulin-like growth factor-I, IGF-I) 在骨骼中含量丰富, 它是刺激骨生成的主要因子。由于 IGF-I 对骨代谢的作用复杂而广泛, 而且存在内分泌、旁分泌、自分泌三种形式, 其调控系统复杂, 但它均要与其受体 (insulin-like growth factor type I receptor, IGF-I R) 结合才能发挥生物学效应。新近研究发现 SNS 在骨量的调控中发挥着关键作用。Cherruau 等采用胍乙啶破坏交感肾上腺素能纤维的作用对交感神经做化学切断的研究显示: 切断交感神经后降钙素相关肽免疫反应神经纤维 (CGRP-IR) 的数目增加, 通过成骨细胞 (osteoblast, OB) 和破骨细胞 (osteoclast, OC) 上的 CGRP 受体促进 OB 分化增殖及抑制 OC 分化和成熟功能^[8,9]。OB 和 OC 上都具有 β_2 肾上腺素能受体 (β_2 adrenoreceptors, $\text{ADR}\beta_2\text{R}$), 该受体激活刺激骨髓 OC 生成而导致骨量的下降, 相反, 抑制该受体则会促进骨形成, 增加骨量^[10]。OP 患者的 OB 骨形成能力降低, 骨丢失大于骨形成导致骨量减少。同时有研究者发现在鼠脑星形细胞上, $\text{ADR}\beta_2\text{R}$ 能影响 IGF-I R mRNA 的表达^[11,12]。因此, 我们推测 SNS 可能影响骨细胞上 IGF-I R 表达而调节 IGF-I 的促进骨生成作用, 从而调节骨代谢。

本研究采用体外细胞培养及 PCR 技术观察了

$\text{ADR}\beta_2\text{R}$ 激动剂/抑制剂作用于鼠 OB 后对 IGF-I R mRNA 表达量, 探讨了 SNS 对骨代谢调节的可能机制。

本研究将培养的第 3 代新生 SD 大鼠 OB 给予不同浓度的 salbutamol ($\text{ADR}\beta_2\text{R}$ 激动剂) 和 ICI-118551 ($\text{ADR}\beta_2\text{R}$ 拮抗剂) 处理, 分别在不同浓度和不同时间对各细胞组行荧光定量 PCR 检测骨形成指标 IGF-I R mRNA 的表达情况。结果显示: OB 上 IGF-I R mRNA 的表达随 $\text{ADR}\beta_2\text{R}$ 激动剂剂量增加而减少, 随 $\text{ADR}\beta_2\text{R}$ 拮抗剂剂量增加而增加; 并且这种变化具有时间依赖性, 96h 时变化最明显。24 ~ 72h 时间段变化幅度最大, 72 ~ 96h 变化幅度有所下降。可能的原因为随时间延长, 培养液中药物和营养物质被逐渐消耗, 细胞代谢废物越来越多, 从而影响了 OB 的功能^[13]。本实验观察到 $\text{ADR}\beta_2\text{R}$ 拮抗剂组 IGF-I R mRNA 的表达在 96h 时增高明显, 是否存在其它因子作用尚不清楚。

IGF-I R 是介导 OB 的成骨活性的主要受体之一, 其基因定位于 15 号染色体上, 它是一种跨膜蛋白, 由两个 α 链和两个 β 链通过二硫键连接成一个异四聚体, 分子量为 450Kd, 其实质是一个内在性配体激活酪氨酸激酶。IGF-I R 的 α 链构成胞外配体结合区, 它决定了配体结合的特异性, β 链组成跨膜区和酪氨酸激酶区, β 链的不同区域可以介导 IGF-I R 不同的生物学活性, 发挥抗细胞凋亡和促有丝分裂等生物学作用^[14]。当 IGF-I R 的 α 链与配体 IGF-I 结合后, 激活了位于 β 链的酪氨酸蛋白激酶, 引起酪氨酸残基和丝氨酸残基自身磷酸化, 激活了胰岛素受体底物 (IRS) -1, 2, 3, 4, Shc 结构域和

PI3K 等多种底物,启动不同细胞信号转导途径,调节相应下游效应物而发挥其生物效应^[15]。

IGF-I R 稳定表达于 OB、OB 前体、骨膜细胞、骨基质细胞、软骨细胞等多种细胞的细胞表面^[16]。IGF-I R 介导了多种骨代谢活动,包括促进 OB 前体向 OB 分化、成熟,促进 OB 增殖,加速骨胶原合成及骨基质矿化、沉积,促进骨碱性磷酸酶(bALP)、骨钙素、I 型胶原等成骨标志物的表达,抑制 OB 调亡,抑制骨基质的降解。

本实验结果表明 ADR β_2 R 激动剂沙丁胺醇能上调 OB 上 IGF-I R mRNA 表达,ADR β_2 R 抑制剂 ICI-118551 则下调 OB 上 IGF-I R mRNA 表达,说明交感神经递质可以通过 ADR β_2 R 调节 OB 上 IGF-I R mRNA 的表达,而影响骨形成因子 IGF-I 对 OB 活动的调控作用,从而调节骨代谢。

【 参 考 文 献 】

[1] Pasco JA, Henry MJ, Sanders KM, et al. Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density:geelong of teoporsis study. J Bone Miner Res, 2004, 19 (1) :19-24.

[2] Levasseur R, Sabatier JP, Potrel-Burgol C, et al. Sympathetic nervous system as transmitter of mechanical loading in bone. Joint Bone Spine, 2003, 70(6) :515-519.

[3] Li Yangling. Propranolol affect to the ovaries rat tibia bone form. Chin J Clin Rehabil, 2005, 47(9) :187-9.

[4] Shen Jian, Chui Liao. Hypothalamic leptin of the sympathetic nervous system and bone mass control. Foreign medical (The archies of endocrinology), 2005, 5:333-335.

[5] Takeuchi T, Tsuhoi T, Arai M, et al. Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation fractor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. Biochem Pharmacol, 2001, 61(5) : 579-586.

[6] Sun Haibiao, Chen Junchang. Prevention of bone loss by injection

of insulin-like growth factor-I after sciatic neurectomy in rats. Chinese Journal of Traumatology, 2013, 16(3) :158-162.

[7] Ardawi MS, Akhbar DH, Alshaikh A, et al. Increased serum sclerostin and decreased serum IGF-I are associated with vertebral fractures among postmenopausal women with type-2 diabetes. Bone, 2013, 56(2) :355-62.

[8] Cherruau M, Morvan FO, Saffar JL. Chemical sympathectomy-induced changes in th-, vip-, and CGRP-immunoreactive fibers in the rat mandible periosteum; influence on bone resorption. J Cellular Physiol, 2003, 194: 341-348.

[9] Han Qinglin, Gou Sanhuai, Wang Qi. Calcitonin gene related peptide (CGRP) regulation of osteoblast function were reviewed. Orthopedic Journal of China, 2005, 13(7) :544-549.

[10] Takeuchi, Toshimitsu, Tsuboi, et al. Adrenergic stimulation of osteoclasto- genesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. Biochemical Pharmacology, 2001, 61 :579-86.

[11] Karoor V, Malbon CC. Insulin-like growth factor-I stimulates phospho-rylation of the beta2-adrenergic receptor in vivo on sites distinct from those phosphorylated in response to insulin. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(46) :29347-52.

[12] Chesik D, Glazenburg L, De Keyser J, et al. Enhanced prdiferation of astrocytes from beta(2) -adrenergic receptor knockout mice is influenced by the IGF system. Journal of Neurochemistry, 2007, 100(6) :1555-64.

[13] Zhang LiHua. Cell biology and cell culture technology (the first edition) . 2003, 78-82.

[14] Navarro M, Baserg R. Limited redundancy of survivals from the type I insulin-like growth factor receptor. Endocrinology, 2001, 142(3) :1073-81.

[15] Le Roith D, Bondy C, Yakar S, et al. The somatomedin hypothesis; 2001. Endocrine Reviews, 2001, 22:53-74.

[16] Romano G. The complex biology of the receptor for the insulin-like growth factor-I . Drug News&Perspectives, 2003, 16 (8) : 525-31.

(收稿日期:2013-11-25)

β 2肾上腺素能受体激动剂 / 拮抗剂对大鼠 OB IGF- I 受体 mRNA 表达的影响

作者: [彭莉](#), [李双庆](#), [PENG Li](#), [LI Shuangqing](#)
作者单位: [彭莉, PENG Li \(上海市浦东新区公利医院内分泌科, 上海, 200135\)](#), [李双庆, LI Shuangqing \(四川大学华西金卡医院, 成都, 610041\)](#)
刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)
年, 卷(期): 2014(5)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201405007.aspx