

橄榄苦苷对成骨细胞 OPG/RANKL mRNA 的影响

刘慧兰 黄惠娟* 李宝恒 吴冬

厦门大学附属东方医院,福州 350025

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 06-0649-04

摘要: 目的 通过测定橄榄苦苷对成骨细胞 OPG/RANKL mRNA 的表达,探讨其治疗骨质疏松症的机制。方法 运用荧光定量 PCR 技术(RT-PCR)检测不同浓度橄榄苦苷不同时间对成骨细胞 OPG/RANKL mRNA 表达量。结果 与阴性对照组比较,RT-PCR 结果显示不同浓度的橄榄苦苷均能促进 OPG mRNA 的表达,并且抑制成骨细胞 RANKL mRNA 的表达。结论 橄榄苦苷可能通过抑制 RANKL 分泌来降低破骨细胞活性,同时促进成骨细胞分泌 OPG,使之与 RANKL 结合增多,间接作用于破骨细胞,使其活性降低,而达到治疗骨质疏松的目的。

关键词: 橄榄苦苷;成骨细胞;OPG/RANKL;mRNA;影响

Effects of oleuropein on OPG/RANKL mRNA expression in osteoblasts

LIU Huilan, HUANG Huijuan, LI Baoheng, WU Dong

Department of Obstetrics and Gynecology, East Hospital Affiliated to Xiamen University, Fuzhou, Fujian 350025, China

Corresponding author: HUANG Huijuan, Email: 834070309@qq.com

Abstract: Objective To explore the mechanism of oleuropein in the treatment of osteoporosis by measuring the expression of OPG/RANKL mRNA in osteoblasts. **Methods** The expression of OPG/RANKL mRNA in osteoblasts was detected using fluorescence quantitative PCR (RT-PCR) in the presence of different solubility of oleuropein at different time. **Results** Compared to the control group, the results of RT-PCR showed that oleuropein of all concentrations promoted the expression of OPG mRNA, and inhibited the expression of RANKL mRNA. **Conclusion** Oleuropein reduces the activity of osteoclasts by inhibiting the secretion of RANKL, and simultaneously promotes osteoblasts to secrete OPG, which combines with RANKL that indirectly affects osteoclasts, leading to the decrease of osteoclast activity and reaching the purpose of the treatment of osteoporosis.

Key words: Oleuropein; Osteoblasts; OPG/RANKLmRNA; Influence

最新国际癌症研究中心(IARC)公布的“2014年全球癌症数据库”(GLOBOCAN 2014)资料显示,卵巢癌占女性肿瘤5%,死亡率居妇科恶性肿瘤首位^[1,2]。卵巢癌术后因雌激素急剧下降,导致骨质疏松症及其骨折等并发症明显增高,严重影响了病人的生活质量。目前国内外对雌激素下降所致的骨质疏松症常采用激素替代治疗(HRT)。HRT虽然降低了骨质疏松和骨折的危险性,但研究证实HRT是卵巢癌发生发展的危险因素^[3],卵巢癌术后引发的骨质疏松症,由于其用药的局限性使得治疗更是难中之难。研究表明^[4],天然橄榄油中富含的橄榄苦苷不仅可减少骨量丢失,还具有抗炎、抗氧化、抗子宫内膜癌、乳腺癌的作用,在防治人工绝经后骨质

疏松症方面具有广阔的前景,尤其是对妇科恶性肿瘤者是可选择天然药物。我们前期实验表明^[5],橄榄油能够提高去势SD大鼠的骨密度。橄榄油中的主要成分橄榄苦苷可以减少骨量丢失而防治骨质疏松^[4],但是橄榄苦苷防治骨质疏松症的机制尚不清楚。本研究采用RT-PCR技术检测不同浓度橄榄苦苷对成骨细胞OPG/RANKL mRNA的表达情况,初步探讨其分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物:新生48hSD大鼠由南京军区福州总医院比较医学科实验动物中心提供。

主要药物及试剂:低糖无酚红DMEM培养基、胎牛血清(购于美国Sigma公司),II型胶原酶购自Gibco公司。0.25%胰蛋白酶(进口分装,购自

基金项目:军区医学科技创新课题(11M111)

* 通讯作者:黄惠娟,Email:834070309@qq.com,15980759803

Sigma 公司)和 NBT/BCIP 碱性磷酸酶染色试剂盒购自上海华美公司。25 cm² 培养瓶、15 mL 离心管、50 mL 离心管购于 sigma 公司。PBS、MTT 试剂购于上海碧云天生物技术有限公司。橄榄苦苷(购于 Funakoshi, Tokyo Japan)。OPG、RANKL、内参 GAPDH 引物均由 Invitrogen, USA 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 成骨细胞的分离、培养、传代:8 只 72h 内新生 SD 乳鼠放于 75% 乙醇中浸泡 10 min; 切下颅盖骨置于加有双抗的 PBS 液内, 清除骨膜、血管等结缔组织, 剪成 1 mm × 1 mm 大小的骨片置于 0.25% 胰蛋白酶溶液中, 并在 37℃ 的恒温水浴中消化 30 min, 之后迅速将离心管放于 1 000 r/min 的离心机中进行离心 10 min。吸去离心后的上清液, 再往离心管加入量为 1 mg/mL 2 型胶原酶即每毫升低糖 DMEM 中加入 1 mg 2 型胶原酶, 在 37℃ 的条件下消化 1 h。消化完后进行离心处理(具体离心条件同上), 吸掉上清液后用含 10% 的胎牛血清 DMEM 制成细胞悬液。细胞接种于 25 cm² 培养瓶中, 放入条件为 5% CO₂、37℃ 培养箱, 24 h 后首次换液, 以后每 2 d 换液 1 次, 待细胞长满瓶底 80% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 并对每传一代细胞进行细胞计数, 和绘制成骨细胞生长曲线, 得出处于对数期成骨细胞用于后期实验。

1.2.2 成骨细胞的鉴定:①成骨细胞按上述方法培养至半汇合, 弃培养液, PBS 洗涤后, 2.5% 戊二醛室温下固定 10 min, PBS 洗涤后用 NBT/BCIP 试剂盒进行碱性磷酸酶染色。②在倒置相差显微镜观察成骨细胞的形态、细胞核、胞浆等。

1.2.3 橄榄苦苷对成骨细胞的干预:将对数期成骨细胞以 1 × 10⁵ 接种于 6 孔板中, 待 24 h 细胞贴壁牢固后, 吸去培养液, 用 PBS 冲洗 2 次, 分别往 6 孔培养孔中加含 0、50、100、200、400 μg/mL 橄榄苦苷的完全培养基, 分别培养 24 h、48 h、72 h。

1.2.4 RNA 提取和 Real-time RT-PCR:用 RNeasy 试剂盒提取细胞总 RNA, 按逆转录试剂盒说明书逆转录合成 cDNA, 然后稀释 3 倍, 取 1 μL 稀释后的 cDNA 进行 Real-time PCR 反应。特异性乳鼠引物序列如下: Rat-GAPDH primer (352bp) Sense primer: 5-AAGGTCGGTGTGAACGGATTT-3; Antisense primer: 5-AGATGATGACCCTTTTGGCCC-3; Rat-OPG primer (373bp) Sense primer: 5-CGAGCCTTATCCCATTTGTAG-3, Antisense primer: 5-AGAGGGCCCATACTCACTAGA-3; Rat-Rankl

primer (361bp) Sense primer: 5-TCGGGTTCCCATAAAGTCA-3, Antisense primer: 5-AAGGGTTGGACACCTGGAC-3。反应条件为: 95℃ 预变性 5 min 后, 95℃ 变性 20 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环, 于 72℃ 延伸阶段检测荧光产物, 生成扩增曲线。在同一反应中, 各组均设 3 个平行重复。以 GAPDH 为内参基因, 通过 RotorGene 分析软件进行定量分析。

1.3 统计学处理

结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS9 统计软件进行各组数据间的方差分析, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

2 结果

2.1 成骨细胞的鉴定

①经碱性磷酸酶染色后, 高倍镜下观察见细胞呈不规则外形, 多突起, 胞浆丰富, 胞浆内富含蓝紫色碱性磷酸酶颗粒, 细胞核不着色, 可见核仁(见图 1a)。②可见大部分细胞贴壁, 伸展, 多呈多边形、纺锤型、三角形、梭形, 胞浆丰富向外伸展出生长突; 胞质丰富清晰; 1 w 左右细胞几乎满布, 形成单层细胞层, 细胞融合成片, 分界较为模糊(见图 1b)。

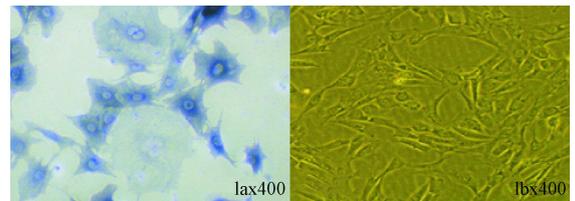


图 1 成骨细胞的鉴定

Fig. 1 Identification of the osteoblast

Under high magnification of the microscope ($\times 400$) the cells were in irregular shape with abundant cytoplasm, rich violet alkaline phosphatase staining in the cytoplasm, and prominent nucleoli without staining (1a). Most cells attached to the well and appeared stretched, multi polygonal, spindle, and triangle shaped with abundant cytoplasm extending outward during the growth process. After a week cells formed a confluent monolayer but the boundary was fuzzy (1b)

2.2 对数期成骨细胞

原代培养的成骨细胞进行传代, 每一代都进行精确地细胞计数, 得出第三代为成骨细胞的对数期(见图 2)。

2.3 不同浓度橄榄苦苷不同时间对成骨细胞 OPG/RANKL mRNA 表达的影响

成骨细胞经过不同浓度橄榄苦苷作用后, RT-PCR 结果表明, RANKL mRNA 表达降低 ($P < 0.05$),

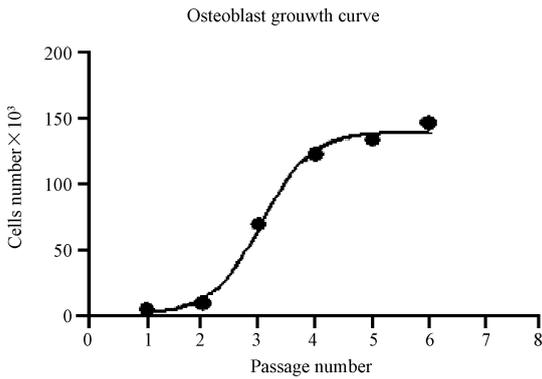


图2 对数期成骨细胞

Fig. 2 Osteoblast growth curve in the logarithmic phase
The primary osteoblasts were subcultured. The third passage was in the logarithmic phase after precise calculation

OPG mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$), 且随着时间的延长差异更明显, 见图 3。

3 讨论

橄榄苦苷 (Oleuropein), 是一种无毒的裂环烯醚萜苷类化合物。裂环烯醚萜 (secoiridoids) 是环戊烷单萜衍生物中的一类化合物, 是由环烯醚萜类化合物裂环而成, 只占环烯醚萜类的很少一部分。橄榄苦苷是一种重要的苯酚类裂环烯醚萜苷, 广泛存在于木樨科的木樨榄属、丁香属、女贞属、木樨属和茉莉属植物中, 到目前为止, 已提取分离出橄榄苦苷的木樨科植物至少在 25 种以上。研究表明, 橄榄苦苷不仅可以减少骨量丢失防治骨质疏松, 还具有抗氧化、抗炎^[6]、抗子宫内膜癌、抗乳腺癌^[7]、保护心血管系统^[8] 及降血糖等作用。

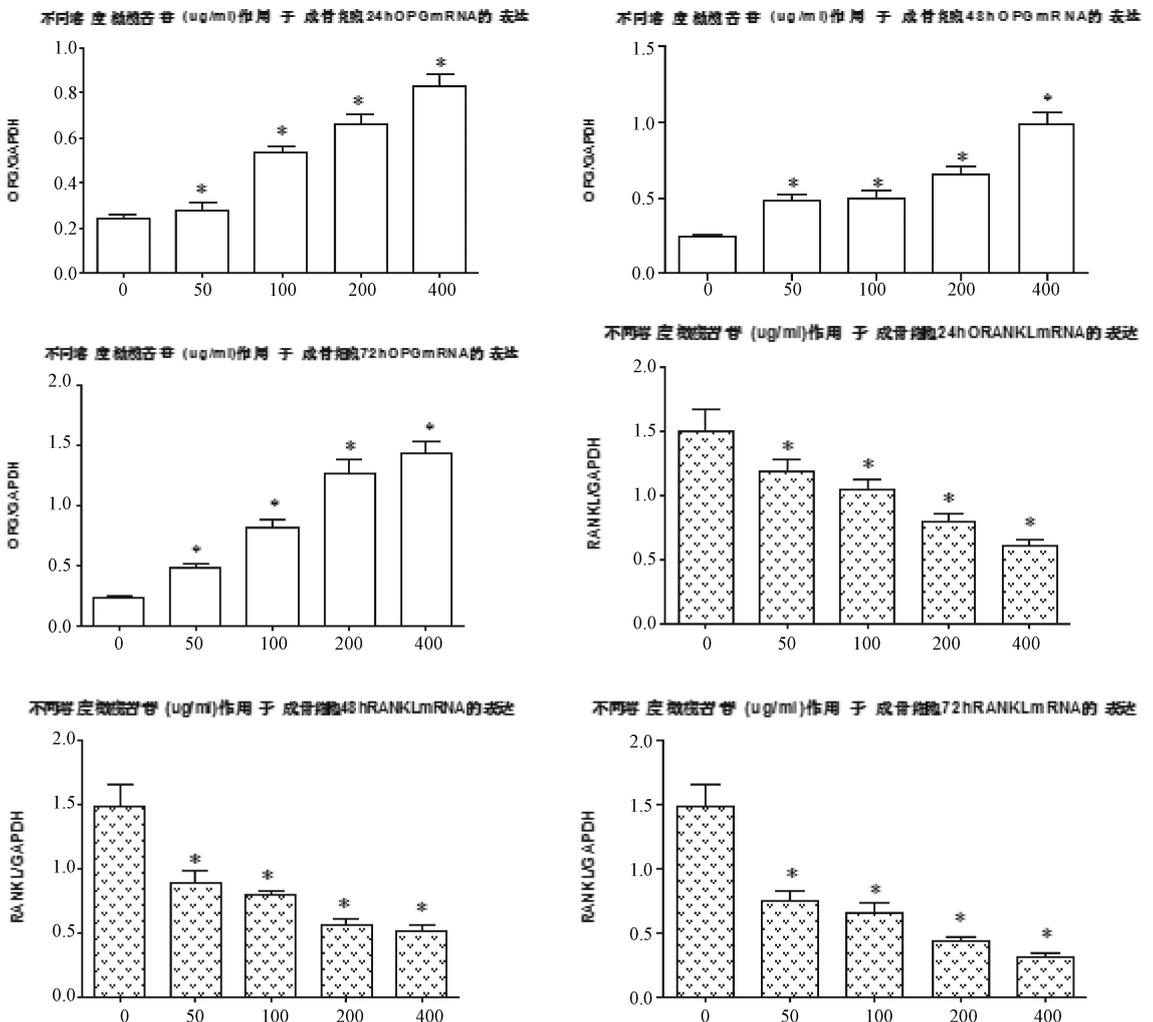


图3 不同溶度橄榄苦苷不同时间对成骨细胞 OPG/RANKLmRNA 表达的影响

Fig. 3 The effect of different concentrations of oleuropein on the expression of RANKL/OPGmRNA at different time points

骨保护素(OPG)/核因子- κ B受体活化因子配体(RANKL)/核因子- κ B受体活化因子(RANK)系统是调控骨代谢的重要通路之一。OPG是一种膜受体,通过高亲和力与RANKL结合,来抑制RANKL与RANK的相互作用,以削弱破骨细胞分化成熟能力和功能活性,限制破骨细胞活跃所导致的过度骨吸收^[9]超家族成员,缺乏穿膜区和细胞质结构域,为可溶性分泌蛋白。目前研究发现^[10],OPG在骨髓、心血管、肾脏、肝脏、脾脏、胎盘、甲状腺、脊髓、脑等多种组织中均有表达。橄榄苦苷可以提高成骨细胞(OB)表达OPG,防治骨质的流失^[11]。本实验显示,橄榄苦苷能够促进成骨细胞的增殖。橄榄苦苷组与阴性对照组比较,成骨细胞OPG mRNA的表达明显上调,由此可以说明橄榄苦苷可能是通过促进成骨细胞表达OPG,使之与RANKL的结合增多,抑制破骨细胞的功能,而达到治疗骨质疏松症的目的。RANKL以两种形式存在于体内,一种以跨膜形式表达于T细胞、软骨细胞、成骨细胞等细胞膜表面,即膜结合型RANKL,其相对分子质量为40 000~45 000;另一种以游离形式存在淋巴组织、骨与软骨组织、关节滑液中,即游离型RANKL,其相对分子质量为31 000。存在于破骨细胞前体细胞膜表面的RANK是前体细胞被激活和分化成破骨细胞最重要的信号通道,而成骨细胞分泌的RANKL能激活该通道,RANKL一旦与RANK结合就会刺激前体破骨细胞分化,活化成熟的破骨细胞,增强破骨细胞的运动能力,延长其存活,抑制破骨细胞凋亡,从而间接促进骨吸收。所以RANKL对于破骨细胞的分化是必需的^[12]。本实验采用RT-PCR技术,与阴性对照组相比,橄榄苦苷对成骨细胞RANKL的表达明显下调,说明橄榄苦苷可能通过抑制成骨细胞表达RANKL,抑制了破骨细胞的活性。

橄榄苦苷可能是通过促进成骨细胞OPG的表达,抑制RANKL的表达,阻断骨吸收信号的传递,阻止破骨细胞的分化与激活,抑制成熟破骨细胞的骨吸收活性,从而诱导破骨细胞的凋亡,来治疗骨质疏松症。推测橄榄苦苷可以运用于骨相关疾病的治疗,进一步拓展橄榄苦苷作用范围。

【参 考 文 献】

- [1] Lyman GH, Khorana AA, Kuderer NM, et al. Venous thromboembolism prophylaxis and treatment in patients with cancer: American society of clinical oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*, 2013, 31(20):2189-204.
- [2] Rebecca Siegel, Ma Jiemin, Zou Zhaohui, et al. *Cancer Statistics*, 2014 *Ca Cancer J Clin*, 2014, 64(3):9-29.
- [3] Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23257 women with ovarian cancer and 87303 controls [J]. *Lancet*, 2008, 371(9609): 303-314.
- [4] Caroline Puel, Jacinthe Mathey, Apostolis Agalias, et al. Dose-response study of effect of oleuropein, an olive oil polyphenol, in an ovariectomy/inflammation experimental model of bone loss in the rat. *Clinical Nutrition*, 2006, 25(4):859-868.
- [5] 黄惠娟,郑小花,李宝恒. 橄榄油对大鼠去势后骨代谢指标及骨密度的影响 [J]. *中国妇幼保健*, 2013, 20(2):3333-3336. Huang HJ, Zheng XH, Li BH. Impact of olive oil on bone metabolic index and bone mineral density of castrated rats. *Maternity and Child Care of China*, 2013, 20(2):3333-3336.
- [6] Carrera-Gonzalez MP, et al. Protective role of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol on cancer. *Trends in Food Science & Technology*, 2013, 31(3) 92-99.
- [7] Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, et al. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition Reviews*, 2010, 68(32):191-206.
- [8] Mohagheghi F, Bigdeli MR, Rasoulani B, et al. Dietary virgin olive oil reduces blood brain barrier permeability, brain edema, and brain injury in rats subjected to ischemia-reperfusion. *Scientific World Journal*, 2010, 10(2):1180-1191.
- [9] Siomonet WS, Lacey DL, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density [J]. *Cell*, 1997, 89(2):309-319.
- [10] Silva I, Branco JC. RANK/RANKL/OPG: literature review [J]. *Acta Reumatol Port*, 2011, 36(3):209-218.
- [11] Caroline Puel, Jacinthe Mathey, Apostolis Agalias, et al. Dose-response study of effect of oleuropein, an olive oil polyphenol, in an ovariectomy/inflammation experimental model of bone loss in the rat [J]. *Clin Nutr*, 2006, 25(5):859-868.
- [12] Clobisys D. Cellular mechanisms of osteolysis [J]. *Bone Joint Surg Am*, 2003, 85(Suppl):4-6.

(收稿日期:2014-07-03;2014-08-06)

更 正

《中国骨质疏松杂志》2014年12月第20卷第12期中,“脂肪组织 chemerin 与骨质疏松症的关系展望”这篇文章的第一作者陈曾应属两个单位:1. 山东中医药大学2012级硕士研究生,济南250014;2. 中国科学院深圳先进技术研究院,广东深圳518056。其余作者所属单位无变化。特此更正。