



## 雌二醇与雷洛昔芬对体外培养成骨细胞生物学功能的影响及护骨素表达的调控

雌激素与拟雌激素(雷洛昔芬)临床上用于绝经后妇女骨质疏松的治疗,雷洛昔芬(raloxifene, RLX)是第二代选择性雌激素受体调节剂(selective estrogen receptor modulator, SERM),有组织特异的雌激素受体激动或拮抗作用,对体内某些(如骨组织)雌激素受体的作用是拟雌激素作用,对另一些雌激素受体的作用则表现为抗雌激素作用。有研究表明RLX可通过抑制破骨细胞(osteoclast, OC)的活性,抑制骨吸收,且对成骨细胞(osteoblast, OB)有刺激作用[1],但对其生物学作用及对护骨素(osteoprotegerin, OPG)的影响尚未见报道。本研究以RLX及雌激素(17- $\beta$ 雌二醇)干预体外培养的成骨细胞,观察成骨细胞的增殖、分化、矿化功能和OPG的表达,从细胞和分子生物学角度了解雌激素与拟雌激素作用的异同。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂

无酚红DMEM培养基(GibcoBRL公司)和胎牛血清(杭州四季青公司),胰酶(美国Sigma公司),II型胶原酶(美国Sigma公司),碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(Sigma公司)。RLX(美国礼来公司),17- $\beta$ 雌二醇(美国Sigma公司),Rizol试剂盒(GIBCO公司),RT-PCR试剂盒(广州宝泰克生物科技公司),DNA marker(广州宝泰克生物科技公司)。

#### 1.2 成骨细胞的分离与培养

取出生24 h的SD大鼠头盖骨(南方医科大学实验动物中心提供),成骨细胞的分离培养具体参照[2]。

#### 1.3 实验分组

DMEM稀释RLX,使其浓度分别为 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 和 $10^{-9}$ mmol/L分别记为实验组1、2、3、4组。阳性对照组(17- $\beta$ 雌二醇组,培养液终浓度为 $10^{-8}$ mmol/L,记为E2)和空白对照组;每次试验每组6孔。

#### 1.4 增殖测定

培养的第二代成骨细胞以 $6 \times 10^3$ /孔密度接种于96孔培养板,24 h后在培养液中加入上述DMEM稀释的RLX、17- $\beta$ 雌二醇,72 h后用MTT方法在酶标仪上进行测试。测试方法及条件参照[3]结果以 $A_{570}$ 表示。

#### 1.5 碱性磷酸酶(ALP)测定

培养的第二代成骨细胞以 $6 \times 10^3$ /孔密度接种于6孔培养板,按上法加药后48 h吸去培养液,细胞经0.1% Triton X-100溶解液破碎制成细胞悬液,取0.1 ml用对硝基苯磷酸盐法(PNPP)测各组ALP活性,另取0.1 ml用考马氏亮蓝法测定蛋白含量,以每毫克蛋白中国际单位(U/mg)表示ALP活性。

#### 1.6 矿化结节形成测定

细胞以 $2 \times 10^4$ 密度接种于12孔塑料培养板( $\Phi 24$  mm)中,2 d换液1次,10 d后按上法加药,于14 d后加入 $\beta$ -磷酸甘油,用95%乙醇原位固定,0.1%茜素红染色(ARS)30 min,用有格(0.2 mm $\times$ 0.2 mm)涤纶薄膜贴附于培养板底部,低倍光镜下对每孔作矿化结节计数,本实验采用双盲法。

### 1.7 半定量RT-PCR

Trizol抽提成骨细胞总RNA。取2 μg总RNA，用逆转录试剂盒合成cDNA，再取1 μl cDNA行PCR扩增OPG基因，以β-actin基因为内对照，引物参照Romas [5]设计，引物序列及扩增条件见表1。PCR扩增产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色、拍照。并用Hema凝胶成像分析系统检测目标条带的OD值，计算目标带与内参照的比值并记录。

表 1 各基因引物序列及扩增条件

Tab.1 Primer sequence and amplifying condition

Gene	Primer sequences (5'→3')	Tm (°C)	Mg <sup>2+</sup> (nmol/L)	Cycles	Length (bp)
OPG	Sense5'-CACAAATGAACAAGTGGCTG-3'	58	1.5	30	1200
	Antisense5'-CCATTCCTAACTATAAGCAGC-3'				
β-actin	Sense5'-GAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'	53	1.6	30	445
	Antisense5'-CTGGAAGGTGGACAGTGAG-3'				

OPG:osteoprotegerin

### 1.8 统计学处理

所有数据采用SPSS10.0 统计软件进行分析，多组比较使用One-way ANOVA的LSD法，组间比较使用配对t检验。

## 2 结果

### 2.1 对成骨细胞增殖率的影响

与对照组相比，不同浓度的RLX对成骨细胞均未表现增殖刺激作用(图1) (P>0.05)； E2与对照组相比差异显著(P<0.01)，对体外成骨细胞表现出明显的增殖刺激作用。

### 2.2 对碱性磷酸酶(ALP)表达的影响

RLX不同浓度、E2给药组培养48 h后，ALP活性与对照组比较上升20. %~31. 8%(图2)，统计检验P<0.01。显示RLX、E2均可促进OB 的ALP表达，但与RLX各浓度组无剂量相关。

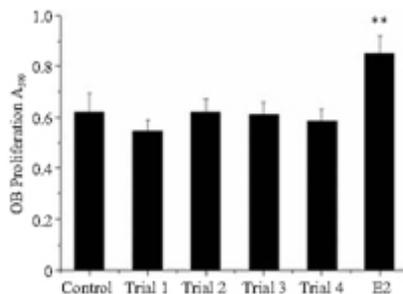


图1 17-β E2, RLX对成骨细胞增殖率(A570)的影响

Fig.1 Effects of on the proliferation of osteoblasts in different groups

Trial 1: RLX in 10<sup>-6</sup> mmol/L; Trial 2: RLX in 10<sup>-7</sup> mmol/L;

Trial 3: RLX in 10<sup>-8</sup> mmol/L; Trial4: RLX in 10<sup>-9</sup> mmol/L;

RLX:raloxifene; E2: Estradiol; Control vs E2,\*\*P<0.01

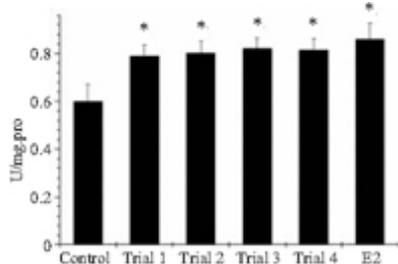


图2 17-β E2、RLX对成骨细胞ALP活性的影响

Fig.2 Comparison of alkaline phosphatase activities between the different groups Control vs trial1-4 and E2,\*P<0.01

### 2.3 对成骨细胞矿化功能的影响

成骨细胞于培养14 d可见矿化结节的形成，茜素红染色后呈现大小、形态不一的红色阳性结节(图3)。结果显示实验2-4组和E2组对矿化结节形成均有明显的刺激作用，与对照组相比差异显著(P<0.05, P<0.01)；实验1组与对照组相比差异不显著(P>0.05)；RLX浓度与矿化结节形成呈剂量相关，浓度低对矿化结节形成的刺激作用明显， $10^{-8}$  mmol/L、 $10^{-9}$  mmol/L RLX与对照组的差异非常显著(P<0.01)； $10^{-8}$  mmol/L RLX组与E2相对矿化刺激无明显差异(P>0.05, 图4)。



图3 E2组14 d的矿化结节

Fig.3 Mineral nodes in estradiol group (Qian-su Red staining, original magnification: ×40)

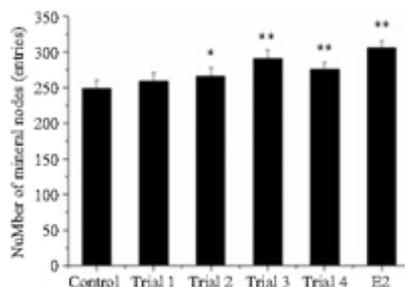


图4 各组之间矿化结节的数目比较(个/孔)

Fig.4 Number of mineral nodes in different groups Control vs trial 1-4 and E2,\*P<0.01, \*\*P<0.01

### 2.4 半定量RT-PCR检测成骨细胞OPG的表达

RT-PCR显示，在大约1200 bp和445 bp处分别出现了扩增条带(图5)，相应地与预期的OPG和β-actin的扩增片段相符，说明OPG和β-actin在各组都有表达。测试各OPG条带单位面积的吸光值，并与各自的内对照β-actin吸光值进行比较。结果显示(图6)，E2能上调成骨细胞中OPG mRNA的表达(P<0.05)，各浓度RLX对OPG mRNA的表达无明显影响(与对照组相比P>0.05)。

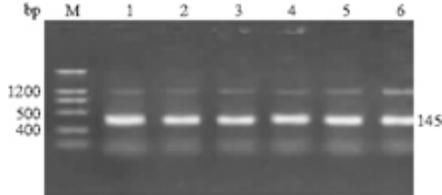


图5 各组OPG和 $\beta$ -actin的RT-PCR扩增结果

Fig.5 RT-PCR of osteoprotegerin and  $\beta$ -actin in different groups  
M: Marker; Lane 1: Control; Lane 2: Trial 1; Lane 3: Trial 2, Lane 4: Trial 3; Lane 5: Trial 4 ; Lane 6: E2

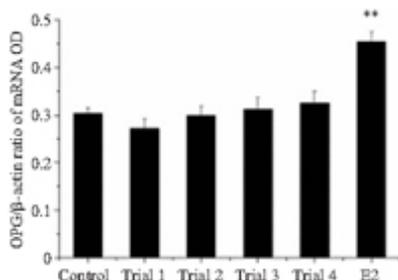


图6 RLX、E2对成骨细胞中OPG表达的影响

Fig.6 Comparison of osteoprotegerin expression of osteoblasts in different groups  
Control vs E2, \*\*P<0.01

### 3 讨论

RLX是SERM的第二代非甾体苯并噻吩衍生物，其对骨的效应为拟雌激素样作用。成骨细胞上有雌激素受体，RLX与雌激素均可通过雌激素受体发挥作用，研究发现雌激素可通过ER依赖方式刺激成骨细胞的分化，增加基质的沉积和矿化[6]。但RLX在此途径上机制不明。我们的实验结果表明：①17- $\beta$ E2能使成骨细胞增殖率提高31.5%；而RLX对成骨细胞的增殖率几无影响；②17- $\beta$ E2与RLX均能增加ALP活性，且两组之间无显著差异；③17- $\beta$ E2、RLX均能使矿化结节形成增加，且矿化结节形成与RLX浓度呈剂量相关，低浓度( $10^{-8}$  mmol/L、 $10^{-9}$  mmol/L)对矿化结节形成刺激作用明显( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )，高浓度(RLX $10^{-6}$  mmol/L)对矿化结节形成影响不显著( $P>0.05$ )；RLX $10^{-8}$  mmol/L组与E2相比对矿化刺激无明显差异( $P>0.05$ )；④17- $\beta$ E2能显著上调OPG蛋白的表达，而RLX对OPG的表达无明显影响。一般认为，SERM对靶组织的效应与所作用受体亲和力、诱导后产生的结构改变等因素相关。17- $\beta$ E2与RLX对雌激素受体 $\alpha$ 及 $\beta$ 的传递活性在典型雌激素应答上相似，但RLX为雌激素受体 $\alpha$ 的部分激动剂、 $\beta$ 的强力转录激活剂，而17- $\beta$ E2使雌激素受体 $\alpha$ 活化同时抑制受体 $\beta$ 引起的转录。由此可见，RLX与雌二醇两者与雌激素受体同一配体结合的亲和力、结合机理及因雌激素受体诱导而引起的结构改变可能不同，导致配体-受体复合物产生微妙的结构差异最终导致以后转录效应有可能不同[7]。我们的研究显示E2、RLX均可影响成骨细胞生物学功能，但产生的生物学效应不完全相同，考虑二者与雌激素受体结合后效应不同可能是其功能差异的原因之一。

成骨细胞的增殖率、ALP活性、OPG蛋白、成熟矿化均是反映成骨细胞生物学功能的指标，ALP的活性是成骨细胞分化的早期标志，其活性的强弱代表骨形成的状况，矿化则是细胞进一步分化成熟的功能表现[8][9]，对成骨细胞增殖的调控可以说是对细胞周期的调控。既往研究多认为RLX主要是通过抑制破骨细胞功能、抑制骨吸收来实现抗骨质疏松作用。但我们的研究表明，RLX可使体外成骨细胞的ALP活性增高、矿化结节形成增加，虽然对细胞周期的调控影响不明显，但可使体外成骨细胞分化、成熟，达到矿化，提示RLX能正向调节成骨细胞，通过影响成骨细胞功能促进骨形成。但可能在部分途径上与E2不同。研究还发现RLX在低浓度即可促进钙化结节的形成，在高浓度则无此种效应， $10^{-8}$  mmol/L浓度与17 $\beta$ -雌二醇相似，支持Taranta等

## [1]的研究结论。

护骨素(OPG)又称破骨细胞生成抑制因子,具有抑制破骨细胞分化、活性和增加骨密度的生物学作用。OB可表达OPG基因,并通过OPG配体(OC分化因子)等调节OC活性,因此OPG是OB与OC间相互调节的偶联因子之一。OPG转基因致过量表达OPG的小鼠呈骨硬化症表型;用重组OPG治疗可预防骨质疏松及逆转骨质疏松。OPG是影响骨密度的重要因子。绝经后因雌激素缺乏导致促骨吸收的细胞因子(如IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6和巨噬细胞集落刺激因子等)表达增加及抗骨吸收的细胞因子(如TGF- $\beta$ 等)合成减少,最终导致OPG的相对量减少,不能有效中和OPG配体,使活性破骨细胞池扩大和骨吸收增加。雌激素的骨保护作用的分子机制尚未完全阐明,一般认为是影响OB与OC间偶联作用所致,我们的研究结果显示E2能上调OB中OPG蛋白的表达,证实雌二醇可通过刺激OB上调OPG表达从而影响OB-OC偶联,进而调节OC活性,这应是雌激素治疗绝经后OP的机制之一。研究同时显示RLX与对照组OPG蛋白表达无明显差异,与雌二醇相比差异显著,显示RLX并无明显上调OPG蛋白表达的作用,提示在通过OPG表达影响OB-OC偶联,影响骨代谢的机制上二者不同。

(责任编辑:吴锦雅)

## 参考文献:

- [1]Taranta A, Brama M, Teti A, et al. The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and osteoblast activity in vitro[J]. Bone, 2002, 30(2): 368-76.
- [2]唐井钢,李娟,吴贺勇. 喂饲补肾中药的血清对成骨细胞的生物学作用[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(11): 1248-50.  
Tang JG, Li J, Wu HY. Biological effect of serum of kidney tonifying traditional Chinese drug-fed rats on cultured osteoblasts[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2004, 24(11): 1248-50.
- [3]朱文菁,金慰芳,张丽丽,等. MTT法分析培养成骨细胞的存活和增殖能力[J]. 上海医科大学学报, 1995, 22(4): 254-7.  
Zhu WJ, Jin WF, Zhang LL, et al. Use of MTT assay for determination of osteoblasts viability and proliferation in vitro[J]. J Shanghai Med Univ, 1995, 22(4): 254-7.
- [4]姜泊,张亚历,周殿元,等. 分子生物学常用试验方法[J]. 北京:人民军医出版社,1996. 53.
- [5]Romas E, Sims NA, Hards DK, et al. Osteoprotegerin reduces osteoclast numbers and prevents bone erosion in collagen-induced arthritis[J]. Am J Pathol, 2002, 161(4): 1419-27.
- [6]Qu Q, Perala HM, Kapanen A, et al. Estrogen enhances differentiation of osteoblast in mouse bone marrow culture[J]. Bone, 1998, 22: 201.
- [7]Fiorelli G, Martineti V, Gori F, et al. Heterogeneity of binding sites and bioeffects of raloxifene on the human leukemic cell line FLG 29.1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 240(3): 573-9.
- [8]HsiehYF, Silva MJ. In vivo fatigue loading of the rat ulna induces both bone formation and resorption and leads to time-related changes in bone mechanical properties and density[J]. J Orthop Res, 2002, 20(4): 764-71.
- [9]Fujita D, Yamashita N, Iita S, et al. Prostaglandin E2 induced the differentiation of osteoclasts in mouse osteoblast-depleted bone marrow cells[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003, 68(5): 351-8.