

白血病抑制因子 mRNA 的表达受雌激素的调控^①

卫 敏 程秋应 黄海宁 李昌本 赵寿元

(复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

摘 要 运用 RT-PCR 方法检测了体外培养的大鼠成骨样细胞 Ros 17 / 2.8 在 17β 雌二醇(E_2)刺激前后细胞中一些细胞因子的 mRNA 水平。发现在 E_2 刺激后, 细胞中白血病抑制因子(LIF)的 mRNA 水平明显上升, 且呈现 E_2 浓度依赖的特点。该结果提示, LIF 可能参与替代性治疗过程中雌二醇对于骨质疏松症的缓解作用。这为进一步研究细胞因子与骨质疏松症的相关性, 阐明细胞因子在骨代谢中的作用打下了基础, 并将有利于发展治疗骨代谢疾病的药物。

关键词 白血病抑制因子, 成骨样细胞, 反转录 PCR

中图分类号 Q39

The Expression of LIF is Regulated by Estradiol

WEI Min CHENG Qiu-Ying HUANG Hai-Ning

LI Chang-Ben ZHAO Shou-Yuan

(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract With RT-PCR techniques, we examined the expression pattern of some cytokines in rat osteoblast-like cell line ROS 17 / 2.8, which was stimulated with 17β -estradiol. After treatment, the obvious increase of LIF(Leukaemia Inhibitory Factor)mRNA level in the cell was observed. It indicates that LIF may involve in the estrogen replacement treatment of osteoporosis. This work will found the base for clarifying the relationship between expression of cytokines and bone remodeling, and may even facilitate the development of drug for bone metabolism abnormality.

Key words Leukaemia Inhibitory Factor(LIF), Osteoblast-like-Cell, RT-PCR

从胚胎发育到老年时期的整个生命过程中, 骨骼始终经历着局部的骨重建过程(bone remodeling), 以适应机体的生长发育及支持功能的变化。正常骨组织的维持有赖于骨重建过程中骨形成和骨吸收的平衡⁽¹⁾, 并受体内多种全身性(systematic)激素(如雌激素等)的调节^(2,3)。越来越多的证据表明, 以前发现的参与调控细胞增殖、分化的许多种局域性因子, 如 IL-1, IL-6, TNF, CSF, TGF- β 等细胞因子都参与了各个时期骨组织生长代谢的调控。它们作为局域性调节因子(local factors), 以自分泌(autocrine)(和)旁分泌(paracrine)的方式调节着骨内各种细胞的增殖、分化和活性。正是它们介导(至少部分介导)了全身性激素的效应, 构成了骨形成和骨吸收的精细调节网络^(4,5,6)。随着对细胞因子作用机制认识的深入, 应用细胞因子作为针对某些骨病的诊断和治疗方法具有广阔的前景。本文报道用反转录 PCR(RT-PCR)方法检测大鼠成骨样细胞株(Ros 17 / 2.8)在 17β 雌二醇刺激前后细胞中白血病抑制因子(Leukaemia Inhibitory Factor, LIF)的 mRNA 水平, 并就 LIF 在雌二醇替代治疗骨质疏松症中的作用作了初步探讨。

^①本项目得到国家教委博士点基金资助。

1 材料和方 法

1.1 细胞株 ROS 17/ 2.8 来源于大鼠骨肉瘤

培养基 Ham F12, 95%; FCS, 5%; 0.8mmol/L CaCl₂; 28mmol/L Hepes buffer 雌二醇(17 β -estradiol, E₂, MERK 公司产品)溶解于 95%乙醇, 配制成 10⁻²mol/L 的储备液。以 2.5 \times 10⁴ 细胞/厘米² 铺板, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养, 待细胞贴壁后加入雌二醇。实验中选择雌二醇刺激浓度: 0 (95%乙醇), 10⁻²mol/L, 10⁻⁷mol/L, 10⁻⁹mol/L, 10⁻¹¹mol/L, 使用时均以 1 000 倍稀释至终浓度。细胞加雌二醇刺激 2 天, 培养至 70~80% 瓶壁被细胞所覆盖(以避免细胞产生接触抑制), 收获细胞以制备细胞总 RNA。

1.2 细胞及组织总 KNA 抽提

异硫氰酸胍-酚一步法抽提细胞总 RNA⁽⁷⁾。含甲醛的变性琼脂糖凝胶电泳, UV₂₆₀ 检测 RNA 质量和浓度。

1.3 转录和 PCR 检测

转录 SuperScript II System GIBCO BRL 公司试剂盒, 按说明书操作。

PCR 检测 FDDK-1 DNA 扩增试剂盒, 按说明书操作。

(1) β -actin, 大鼠

引物 1 5'-TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGTAAG-3'

引物 2 5'-CCTAGAAGCATTGCGGTGCACGATGGAGG-3'

从成熟 mRNA 的反转录产物中预计可扩增出 285bp 的片断。

(2) Transforming Growth Factor, TGF- β 1; 大鼠

引物 1 5'-AATACGTCAGACATTCGGGAA-3'

引物 2 5'-GTCAATGTACAGCTGCCGTAC-3'

从成熟 mRNA 的反转录产物中预计可扩增出 498bp 的片断。

(3) Leukaemia Inhibitory Factor, LIF; 大鼠

引物 1 5'-CAATGCCCTCTTTATTTCTATTACACAGC-3'

引物 2 5'-GGGGACACAGGGCACATCCACATGGCCCAC-3'

从成熟 mRNA 的反转录产物中预计可扩增出 333bp 的片断。

PCR 反应: 95 $^{\circ}$ C 120s, (93 $^{\circ}$ C 45s, 55 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 60s)₃₀循环, 72 $^{\circ}$ C 400s 进行 PCR 扩增, 以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结 果 和 讨 论

正常培养条件下, 在成骨样细胞株中几乎检测不到 LIFmRNA; 在雌二醇处理后, LIFmRNA 水平有较明显的上升(以 β -actin 为内对照)且显示出雌二醇浓度依赖的特点(图 1), 同时, 我们检测了雌二醇刺激前后该细胞株中 TGF β 1 的 mRNA 水平, 其表达量较 LIF 高且未见明显变化(见图 1)。

雌二醇是一种重要的全身性骨代谢调节激素, 在激素替代性疗法中用于缓解绝经后妇女的骨质疏松症状。雌二醇处理的成骨样细胞株中发现 LIF mRNA 水平上升是一非常有趣的现象, 提示 LIF 的表达(至少部分)受到雌二醇的调控, 它可能参与机体的骨代谢调节过程(另外, 我们发现 LIF 在正常三月龄大鼠的骨髓细胞和骨干组织中都有表达(未发表资料)。

目前关于 LIF 对骨重建过程作用的研究还刚刚起步。从现有结果看, LIF 对骨细胞的影响可分为两个方面: (1) 协同其它一些细胞因子(如 IL-6, M-CSF, G-CSF 等)参与调节了前体破骨细胞的发育成熟; (2) 直接刺激成熟破骨细胞, 上调其骨吸收活性。已经有实验表明, 当 GM-CSF 不存在或延迟出现时, LIF 对正常的造血祖细胞的促分化作用(分化为 GM-CSF 依赖的 CFU-GM) 会加速 CFU-GM (Colony Forming

Unit-Granulocyte-Macroycte) 的死亡。E₂ 可下调骨内成骨细胞或其他骨细胞 IL-6, CSF 等的分泌, 而这些细胞因子是造血骨细胞分化为破骨细胞(破骨细胞由 CFU-GM 和成熟巨噬细胞分化而来)的重要调节因子。E₂ 可能通过刺激成骨细胞产生 LIF, 促进前体破骨细胞分化, 同时又下调其它一些破骨细胞成熟所必需的细胞因子, 导致成熟破骨祖细胞的产生受阻, 从而抑制骨吸收。

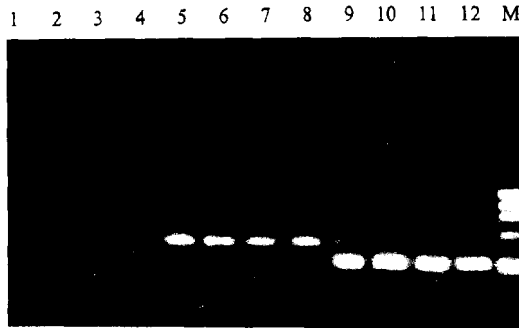


图 1 细胞总 RNA 的反转录 PCR 检测 β -actin, TGF- β 和 LIF 的结果

1. ROS17 / 2.8+E₂(10⁻⁷mol / L)-LIF; 2. ROS17 / 2.8+E₂(10⁻⁹mol / L)-LIF; 3. ROS17 / 2.8+E₂(10⁻¹¹mol / L)-LIF; 4. ROS17 / 2.8+E₂(0)-LIF; 5. ROS17 / 2.8+E₂(10⁻⁷mol / L)-TGF- β ; 6. ROS17 / 2.8+E₂(10⁻⁹mol / L)-TGF- β ; 7. ROS17 / 2.8+E₂(10⁻¹¹mol / L)-TGF- β ; 8. ROS17 / 2.8+E₂(0)-TGF- β ; 9. ROS17 / 2.8+E₂(10⁻⁷mol / L)- β -actin; 10. ROS17 / 2.8+E₂(10⁻⁹mol / L)- β -actin; 11. ROS17 / 2.8+E₂(10⁻¹¹mol / L)- β -actin; 12. ROS17 / 2.8+E₂(0)- β -actin; M. ϕ X174 / HaeIII DNA Marker.

已知 TGF- β 在成骨样细胞中有表达, 它也参与骨代谢的调控^[8], 我们也检测了该细胞中 TGF- β 的 mRNA 水平作为检测细胞中细胞因子 mRNA 水平的一个对照。深入研究 LIF 对骨代谢的调控, 阐明其在 E₂ 替代疗法(Replacement Therapy)治疗骨质疏松症中的作用, 将为发展针对骨质疏松的诊疗手段打下基础。

参 考 文 献

- 1 Frost H M. Intermediary Organization of the Skeleton, 1986, CRC Press
- 2 Riggs B L, Melton L J 3d. Involutional osteoporosis. The New England Journal of Medicine, 1986, 314(26): 1676~1684
- 3 Turner R T *et al.* Skeletal effects of estrogen. Endocrinology, 1994, 15(3): 275~300
- 4 Mundy G R. Cytokines and local factors which affect osteoclast function. International Journal of Cell Cloning, 1992, 10(4): 215~222
- 5 Lorenzo J A. The role of cytokines in the regulation of local bone resorption. Critical reviews in Immunology, 1991, 11(3~4): 195~213
- 6 Gowen M. Cytokines and Bone Metabolism, 1992, CRC Press
- 7 Gough N M. Rapid and quantitative preparation of cytoplasmic RNA from small number of cells. Analytic Biochemistry, 1988, 173(1): 93~95
- 8 Centrella M *et al.* Transforming growth factor-beta gene family members and bone. Endocrinology, 1994, 15(1): 27~39

1998-01-20 收稿, 1998-03-13 修回。

欢迎订阅《国外医学遗传学分册》

《国外医学遗传学分册》由国家卫生部主管, 哈尔滨医科大学主办, 1978 年创刊。本刊主要报道国外医学遗传学方面的最新研究进展与动态, 读者对象为我国高、中级医学遗传学及相关学科的医疗、预防、科研与教学人员。

《国外医学遗传学分册》为双月刊, 56 页, 订价 3.00 元, 邮发代号: 14-55。积极刊登专业性广告及书讯等, 编辑部地址: 150086 哈尔滨医科大学内, 电话: (0451) 6662947; 网址: <http://www.hrbmu.edu.cn>