

# XW630 对大鼠成骨细胞 TGF- $\beta_1$ 和 I 型胶原基因表达调控的研究

费伟 王大章 郑虎 翁玲玲 邓力

**摘要** 目的:探讨抗骨质疏松新药 XW630 促进成骨作用的机理。方法:提取并标记制备 TGF- $\beta_1$  和 Col I 基因的 cDNA 探针,将 3 种不同药物作用于大鼠成骨细胞 24、72 h 后,提取细胞总 RNA,并与 TGF- $\beta_1$  和 Col I 基因的 cDNA 探针进行狭缝杂交。结果:XW630 具有促进大鼠成骨细胞中 TGF- $\beta_1$  和 Col I mRNA 表达的作用,在相同浓度 ( $10^{-6}$  mol/L) 下,其作用优于四环素加哌嗪雌酮和单纯雌酚酮 ( $P < 0.05$ )。结论:XW630 可能通过促进 TGF- $\beta_1$  和 Col I mRNA 的表达而促进成骨作用。

**关键词** 成骨细胞 转化生长因子  $\beta_1$  I 型胶原 基因表达

## Regulation of XW630 on TGF- $\beta_1$ and Collagen Gene Expression in Osteoblasts

Fei Wei

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Sichuan Provincial People's Hospital

Wang Dazhang, Zheng Hu, Weng Lingling, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

### Abstract

**Objective** :The purpose of this part of study was to investigate the mechanism of a new anti-osteoporotic drug, XW630 on promoting osteogenic activity. **Methods** :Total RNA were isolated from osteoblasts of the mice after the reaction with XW630 in 24 and 72 hours, that were hybridized with the extracted and digoxigenin-labeled TGF- $\beta_1$  and the collagen I cDNA probes. **Results** :XW630 significantly promoted TGF- $\beta_1$  and collagen I gene expression in osteoblasts, and this drug was superior than other two kinds of estrogen in promoting osteogenic activity ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** :XW630 promote osteogenic activity of osteoblasts, probably by enhancing the mRNA expression of TGF- $\beta_1$  and collagen I.

**Key words** : osteoblast TGF- $\beta_1$  collagen I gene expression

转化生长因子 (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 是一类具有多种生物学功能的蛋白多肽,主要有 TGF- $\beta_1$  和 TGF- $\beta_2$  两种分子形式,分泌的 TGF- $\beta$  大多是以非活化状态的 TGF- $\beta$  前体形式存在<sup>1,2</sup>。骨是 TGF- $\beta$  的最大组织来源,骨组织产生的 TGF- $\beta$  主要是 TGF- $\beta_1$ ,而与之有 70% 同源性的 TGF- $\beta_2$  含量较少,约占骨 TGF- $\beta$  总量的 20%,且 TGF- $\beta_2$  在骨

组织中的分布比 TGF- $\beta_1$  局限<sup>3,4</sup>。TGF- $\beta_1$  可促进成骨细胞的增殖,并可促使成骨细胞由不成熟型向成熟型分化。因此,TGF- $\beta_1$  可视为反映成骨细胞功能成熟状况的特异性指标之一。骨基质由成骨细胞合成并分泌的骨胶原矿化后形成,其有机成分中 90% 为胶原,且以 I 型胶原为主<sup>5</sup>。因此,I 型胶原(collagen I, Col I) 也可视作反映成骨细胞功能状态的指标之一<sup>6</sup>。本研究以大鼠颅骨成骨细胞为体外模型,着重从分子转录水平上研究 XW630 对成骨细胞 TGF- $\beta_1$  和 Col I 基因表达的影响,探讨其对成骨细胞代谢的影响及其促进成骨细胞成骨作用的机理,为其进一步的临床应用提供理论和实

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 39430120)

作者单位:610072 四川省人民医院口腔颌面外科(费伟),  
四川大学华西口腔医学院口腔颌面外科学教研室(王大章),四川  
大学华西药学院药物化学研究室(郑虎,翁玲玲,邓力)

验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

含型胶原 cDNA 片段的质粒 DNA pSP65, 含  $\beta$ -actin cDNA 片段的质粒 DNA pBluescript SK 和含 TGF- $\beta_1$  cDNA 片段的质粒 DNA pUC118(均由四川大学华西口腔医学院章锦才教授惠赠); 小量质粒纯化试剂盒 (Watson, 上海); 细胞总 RNA 分离纯化试剂盒 (Gene Company Ltd, 美国), 限制性内切酶 EcoR、Hind、低熔点琼脂糖 (Gibco Brl, 美国), 无 DNA 酶的 RNase、无 RNA 酶的 DNase (华美生物工程公司), 地高辛标记检测试剂盒及尼龙膜 (Boehringer Mannheim, 德国), DEPC (Sigma Chemicals), 其它均为进口分装或国产分析纯试剂。

UV-265 型紫外分光光度仪; Minifold 型点膜器 (Schleicher & Schuell 公司); BACKMAN GDS-200 型密度扫描仪。

### 1.2 目的基因 cDNA 片段的提取、回收

将大肠杆菌 HB101 接种至 LB 琼脂培养基中过夜培养增菌, 用小量质粒纯化试剂盒提取和纯化 3 种获赠质粒, 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收目的基因 cDNA 片段。用 UV-265 型紫外分光光度仪测定 OD<sub>260nm</sub> 和 OD<sub>280nm</sub> 值, 计算其浓度和纯度后, 置-20 储存备用。

### 1.3 地高辛标记 cDNA 探针

取 2  $\mu$ g 回收的 cDNA 探针, 用水稀释至 5  $\mu$ l 后, 100 水浴 10 min 使之变性。按地高辛标记检测试剂盒操作手册, 采用随机引物法标记 3 种获赠质粒 cDNA 探针, 置-20 储存备用。

### 1.4 成骨细胞分离、培养及实验分组

健康成年 SD 雌性大鼠 30 只, 体重 250 g 左右, 断头处死, 取头颅骨浸于 75% 乙醇中 1 min, 刮净骨膜及软组织, 参照 Kato 等<sup>7</sup> 方法分离、培养大鼠成骨细胞, 培养条件为 37、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub>。实验分为 4 组: 空白对照组; 雌酚酮组; 四环素加哌嗪雌酮组; XW630 组。每组 3 瓶细胞, 分 24 h、72 h 时间点, 共计 24 瓶。接种的细胞培养至贴壁生长 24 h 后, 弃原培养液, 新的培养液除空白组外, 分别加入浓度为 10<sup>-6</sup> mol/L 的各组药物。加药 24 h、72 h 后, 按试剂盒操作手册, 每组取 3 瓶细胞抽提细胞总 RNA。取 5  $\mu$ l 提取的 RNA 液, 测 OD<sub>260nm</sub> 和 OD<sub>280nm</sub> 值, 确定 RNA 的纯度和含量。

### 1.5 狭缝杂交及密度扫描

取 RNA 4  $\mu$ g, 依次等倍稀释即 4  $\mu$ g、2  $\mu$ g、1  $\mu$ g, 分别加甲酰胺 20  $\mu$ l, 37% 甲醛 7  $\mu$ l, 20  $\times$ SSC 2  $\mu$ l, 60 水浴 15 min 变性。变性后的 RNA 与尼龙膜在 Minifold 型点膜器上发生交联。交联后的尼龙膜放入装有 4 ml 杂交液的塑料袋中, 50 水浴 2 h 后, 移入另外 4 ml 杂交液中, 加入 DIG 标记的

cDNA 探针 0.2  $\mu$ g, 50 水浴, 杂交过夜。待尼龙膜显色、晾干后, 在 BACKMAN GDS-200 型密度扫描仪上以反射波, 0.3 mm 窄缝, 快速扫描, 自动记录各样本密度值及波形 (图 1~4)。以  $\beta$ -actin 作为内参照, 计算相对含量。

## 2 结果

### 2.1 大鼠颅骨成骨细胞 TGF- $\beta_1$ mRNA 水平的变化

不同时间各组对成骨细胞 TGF- $\beta_1$  mRNA 表达水平影响的狭缝杂交及灰度扫描结果见图 1、2, 自动记录的各样本相对密度值见表 1。由表 1 及图 1、2 可知: 给药 24 h 后, 与空白对照组相比, 3 个给药组成骨细胞 TGF- $\beta_1$  的 mRNA 水平均升高, 其中, XW630 促进 TGF- $\beta_1$  mRNA 表达水平的作用最强, 与空白对照组之间存在显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 而与另外两个给药组相比, 也存在显著差异 ( $P < 0.05$ ); 给药 72 h 后, 除空白对照组 TGF- $\beta_1$  mRNA 水平基本保持不变外, 其余 3 个给药组 TGF- $\beta_1$  的 mRNA 表达水平较相应 24 h 时为高。与空白对照组相比, XW630 促进 TGF- $\beta_1$  mRNA 表达水平作用最强 ( $P < 0.01$ ), 四环素加哌嗪雌酮次之 ( $P < 0.05$ ), 而 XW630 与另外两个给药组相比仍存在差异 ( $P < 0.05$ )。

表 1 不同时间各组对成骨细胞 TGF- $\beta_1$  mRNA 表达水平的影响

时间	相对密度值 ( $\times 10^3$ )			
	空白对照组	雌酚酮组	四环素加哌嗪雌酮组	XW630 组
24 h	3.85 $\pm$ 0.59	5.30 $\pm$ 1.09	5.99 $\pm$ 1.02	8.37 $\pm$ 0.89 **
72 h	4.09 $\pm$ 0.89	6.66 $\pm$ 1.13	7.04 $\pm$ 1.12 *	9.96 $\pm$ 0.76 **

与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 XW630 组比较:  $P < 0.05$

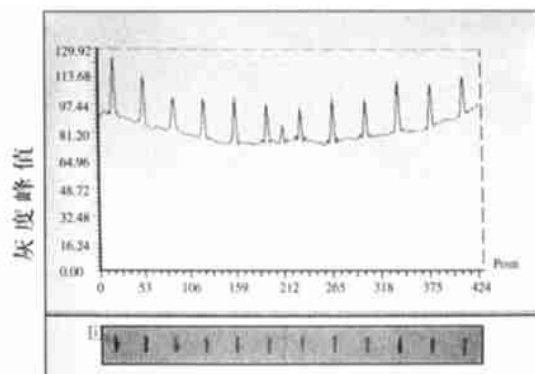


图 1 各样本 24 h 总 RNA 与 TGF- $\beta_1$  cDNA 探针杂交及灰度扫描  
狭缝 1~3 为 XW630 组; 狭缝 4~6 为雌酚酮组; 狭缝 7~9 为空白对照组; 狭缝 10~12 为四环素加哌嗪雌酮组, 以下同

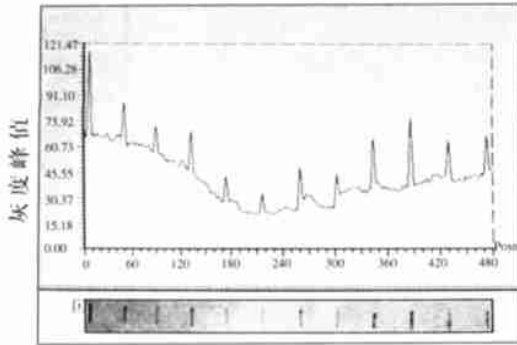


图2 各样本 72 h 总 RNA 与 TGF-1 cDNA 探针杂交及灰度扫描

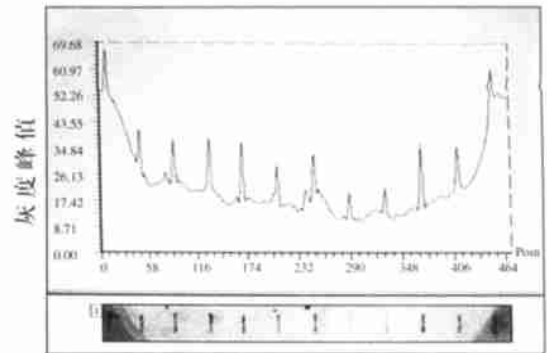


图4 各样本 72 h 总 RNA 与 Col cDNA 探针杂交及灰度扫描

### 2.2 大鼠颅骨成骨细胞 Col mRNA 水平的变化

各组对大鼠颅骨成骨细胞 Col mRNA 水平影响的狭缝杂交及灰度扫描结果见图 3、4,自动记录的各样本相对密度值见表 2。由表 2 及图 3、4 可知:给药 24 h 后,3 个给药组成骨细胞 Col mRNA 水平较空白对照组为高。其中,XW630 促进 Col mRNA 表达水平作用最强,与空白对照组、雌酚酮组、四环素加哌嗪雌酮组相比均存在显著差异 ( $P < 0.05$ );给药后 72 h,除空白对照组 Col mRNA 水平基本不变外,其余 3 个给药组 Col 的 mRNA 表达水平较相应 24 h 高。与空白对照组相比,XW630 促进 Col mRNA 表达水平作用最强 ( $P < 0.01$ ),四环素加哌嗪雌酮次之 ( $P < 0.05$ ),而 XW630 与另外两个给药组相比仍存在差异 ( $P < 0.05$ )。

表 2 不同时间各组成骨细胞 Col mRNA 表达水平的影响

时间	相对密度值 ( $\times 10^3$ )			
	空白对照组	雌酚酮组	四环素加哌嗪雌酮组	XW630 组
24 h	2.86 $\pm$ 1.06	4.28 $\pm$ 1.01	4.49 $\pm$ 1.07	6.96 $\pm$ 1.10 **
72 h	3.04 $\pm$ 1.23	5.19 $\pm$ 0.69	5.71 $\pm$ 1.17 *	8.02 $\pm$ 1.19 **

与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与 XW630 组比较:  $P < 0.05$

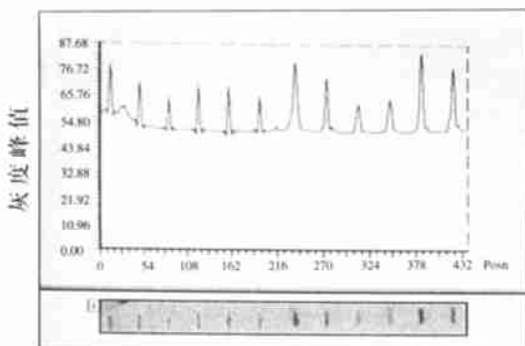


图3 各样本 24 h 总 RNA 与 Col cDNA 探针杂交及灰度扫描

### 3 讨论

骨组织代谢是一个极其复杂的过程,受到多种因素的影响和制约。就其内在因素而言,主要是内分泌激素调节钙磷代谢的系统调节作用和细胞因子的局部调节作用。现有研究表明,除雌激素受体(ER)外,雌激素( $E_2$ )对成骨细胞的作用还可通过 IGF-1、IGF- 运载蛋白和 TGF- 等旁分泌细胞因子调节<sup>8</sup>。转化生长因子 是一个调控蛋白大家族,广泛存在于正常组织细胞及转化细胞中,以骨组织及血小板中含量最为丰富。其分子量为 25 kD,属二硫键同型二聚体,目前已发现有 5 种异构体<sup>9</sup> 即 TGF-<sub>1</sub>、TGF-<sub>2</sub>、TGF-<sub>3</sub>、TGF-<sub>4</sub> 和 TGF-<sub>5</sub>。骨组织中含 TGF- 的细胞种类较多,包括间质细胞、成纤维细胞、成骨细胞、骨细胞和软骨细胞等。在骨折愈合过程中,分布在间质细胞、成骨细胞及软骨细胞中的 TGF- 明显增多,且其 mRNA 表达水平也显著提高<sup>10,11</sup>。1983 年,Assoian 等<sup>12</sup> 首先从人血小板中分离纯化了 TGF-<sub>1</sub>。其后的大量研究证实,TGF-<sub>1</sub> 是一种具有双向调节作用的生长因子,可促进成骨细胞的增殖,并促使成骨细胞由不成熟型向成熟型分化<sup>13~15</sup>。本研究从大鼠颅骨中分离、培养成骨细胞,加入相同浓度( $10^{-6}$  mol/L)的 3 种雌激素 24 h 和 72 h 后,各组成骨细胞的 TGF-<sub>1</sub> mRNA 表达水平较空白对照组高。其中,XW630 组成骨细胞的 TGF-<sub>1</sub> mRNA 水平与空白对照组之间存在显著性差异 ( $P < 0.01$ ),且与另外两个给药组之间也存在差异 ( $P < 0.05$ )。由此可见,抗骨质疏松新药 XW630 对成骨细胞中 TGF-<sub>1</sub> mRNA 表达具有显著的促进作用。XW630 促进成骨细胞自身 TGF-<sub>1</sub> mRNA 的表达,成骨细胞合成、分泌 TGF-<sub>1</sub> 增加,而 TGF-<sub>1</sub> 的增加又反过来促进成骨细胞的增殖与分

化。因此, XW630 促进成骨的作用可能通过促进 TGF- $\beta_1$  mRNA 的表达水平来调节。

型胶原是骨基质中最主要的有机成分, 骨基质的 90% 由胶原组成。在正常生理状态下, 成骨细胞合成并分泌骨的有机质, 主要为骨胶原(以 I 型胶原为主, I 型胶原常与之共存), 骨钙素蛋白、多糖类、脂质等较少。I 型胶原之间相互交联形成骨基质的基本框架, 其纤维间空隙区域间距离为 0.5 nm, 与羟磷灰石钙离子间的距离相一致, 这为骨基质的矿化提供了良好的结构基础。机体吸收的钙离子和焦磷酸裂解的磷离子合成羟磷灰石(骨无机盐的主体)转运至骨胶原间区域内, 按一定的电位极性排列、沉积, 羟磷灰石中的钙离子与胶原内骨钙素分子经  $\beta$  逆转的  $\beta$  单环结构的 2 个 Ga 残基形成化学键, 从而完成骨基质的正常矿化<sup>8</sup>。因此, I 型胶原在正常骨代谢中起着相当重要的作用。本研究狭缝杂交结果表明, 加入相同浓度 ( $10^{-6}$  mol/L) 的 3 种雌激素 24 h 和 72 h 后, 各组成骨细胞的 I 型胶原 mRNA 表达水平均较空白对照组高, 其中, XW630 组在给药 24 h 后, 成骨细胞的 Col I mRNA 水平与空白对照组及另两个给药组之间都存在差异 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 给药 72 h 后, 与空白对照组及单纯雌酚酮组之间仍存在差异 ( $P < 0.05$ )。由此可见, 抗骨质疏松新药 XW630 对成骨细胞中 Col I mRNA 的表达具有显著的促进作用, 并以此来调节骨基质的矿化过程。

### 参考文献

- Marquardt H, Lioubin MN, Ikeda T. Complete amino acid sequence of human transforming growth factor type- $\beta_2$ . J Biol Chem, 1987, 262(12): 12127 ~ 12131
- Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, et al. Human transforming growth factor- $\beta$  cDNA sequence and expression in normal and transformed cells. Nature, 1985, 316(1): 701 ~ 703
- Sporn MB, Robert AB, Wakefield LM, et al. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor- $\beta$ . J Cell Biol, 1987, 105(3): 1039 ~ 1045
- Sandberg M, Autio-Harminen H, Vuorio E. Localization of the expression of type I and II collagen, TGF- $\beta_1$  and c-fos genes in developing human calvarial bones. Dev Biol, 1988, 130(1): 324 ~ 334
- 李玉瑞主编. 细胞外间质的生物化学及研究方法. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 3 ~ 10
- Wenstrup RJ, Fowlkes JL, Witte DP, et al. Discordant expression of osteoblast markers in MC 3T3-E $_1$  cells that synthesize a high turnover matrix. J Biol Chem, 1996, 271(17): 10271 ~ 10276
- Kato H, Matuo R, Komiyama O. Decreased mitogenic and osteogenic responsiveness of calvarial osteoblasts isolated from aged rats to basic fibroblast growth factor. Gerontology, 1995, 41(Suppl): 20 ~ 23
- 刘忠厚主编. 骨质疏松学. 北京: 科学出版社, 1998: 91 ~ 95
- Sporn MB, Robert AB, Wakefield LM, et al. Transforming growth factor- $\beta$ : biological function and chemical structure. Science, 1986, 233(1): 532 ~ 534
- Joyce ME, Jingushi S, Bolander ME. Transforming growth factor- $\beta$  in the regulation of fracture repair. Orthop Clin North Am, 1990, 21(2): 199 ~ 209
- Joyce ME, Terek R, Jingushi S, et al. Transforming growth factor- $\beta_1$  is expressed and synthesized during fracture healing. Ann New York Acad Sci, 1990, 593(1): 347 ~ 355
- Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, et al. Transforming growth factor- $\beta$  in human platelets: identification of a major storage site purification and characterization. J Biol Chem, 1983, 258(11): 7155 ~ 7160
- Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Transforming growth factor- $\beta$  is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. J Biol Chem, 1987, 262(6): 2869 ~ 2874
- Ibbotson KJ, Orcutt C, Anglin AM, et al. Effects of transforming growth factor  $\beta_1$  and  $\beta_2$  on a mouse clonal osteoblastlike cell line MC 3T3-E $_1$ . J Bone Miner Res, 1989, 4(1): 37 ~ 42
- Hock JM, Canalis E, Centrella M. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates bone matrix apposition and bone cell replication in cultured fetal rat calvariae. Endocrinology, 1990, 126(1): 421 ~ 426

(2001-01-18 收稿, 2001-08-31 修回)  
(本文编辑 刘 怡)