

蛇床子素对大鼠成骨细胞中 OPG 和 RANKL 基因 mRNA 表达的影响

胡彬 吴翠环 陈璐璐

【摘要】 目的 观察蛇床子素(OST)对体外培养的大鼠成骨细胞中 OPG 中 RANKL 基因表达的影响。**方法** 新生 SD 大鼠颅骨成骨细胞培养,设空白对照组和用不同浓度蛇床子素培养液(10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol/L)培养处理的大鼠成骨细胞为实验组,未经处理的细胞为空白对照组,分别提取 48 h 和 7 d 的细胞总 mRNA,用 RT-PCR 技术分析 OPG/RANKL 的 mRNA 表达情况进行半定量比较。**结果** 48 h 两基因都已有表达,相对空白对照组,OST 上调 OPG mRNA 的表达($P < 0.05$),但对 RANKL 的表达无显著影响,OPG/RANKL 比值变大;7 d 时 OPG 和 RANKL 表达都有增加,OST 上调 OPG 的表达($P < 0.01$),OST 在 10^{-5} mol/L 下调 RANKL 的表达($P < 0.05$),OPG/RANKL 比值增大。**结论** OST 可以增加大鼠成骨细胞 OPG 的表达,同时轻微抑制 RANKL 的表达,早期对 RANKL 的表达影响不大。

【关键词】 成骨细胞;蛇床子素;骨保护素;RANKL;机制探讨

Effects of osthole on expressions of OPG and RANKL in rat osteoblasts HU Bin¹, WU Chuihuan², CHEN Lulu³ 1. Bone Biology Laboratory of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 2. Department of Pathology of Tongji Medical College, Wuhan 430030, China; 3. Department of Endocrinology, Union Hospital of Tongji Medical College, Wuhan 430022, China

【Abstract】 Objective To study the effects of osthole(OST) on expression of OPG and RANKL mRNA in rat osteoblasts. **Methods** Calvariae were obtained from Sprague-Dawley rats(24h after birth), bones samples were processed by collagenase/trypsin digestion, and the osteoblasts were cultured *in vitro*. 48h and 7 days after addition of osthole (0 , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol·L⁻¹) to the culture medium of osteoblasts, total mRNA was prepared from osteoblasts, and mRNA expression of OPG and RANKL were detected by RT-PCR. **Results** 48h after treatment with OST, the genes of OPG and RANKL were both expressed. Compared with the controls, OST increased the expression of OPG mRNA but had no effect on the expression of RANKL mRNA, the OPG/RANKL ratio being increased markedly in the treatment group. The mRNA expressions of OPG and RANKL were both increased 7 days after treatment with OST. OST at 10^{-5} mol·L⁻¹ increased the expression of OPG mRNA, but decreased the expression of RANKL, the OPG/RANKL ratio in the treatment group was also increased, compared with the control. **Conclusions** Osthole stimulates the OPG mRNA expression of osteoblasts and decreases RANKL mRNA level. And osthole has no effect on the expression of RANKL mRNA at the early stage of the experiment.

【Key words】 Osthole; Osteoblasts; OPG; RANKL; Mechanism

蛇床子素(Osthole)是中药蛇床子的香豆素类的主要化学成分^[1],动物实验证实蛇床子素有显著的抑制骨吸收、降低骨转换的疗效^[2]。现代的研究表明在预防骨质疏松性骨折治疗中,骨转换是一个可靠的观察指标^[3]。骨通过骨重建成为不断新陈代谢的有生命的组织,骨转换是反映骨重建状况的重

要指标,它受到 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、PTH、 PGE_2 等重要的钙调节激素和细胞因子的调节,而直接影响破骨细胞的分化成熟和功能作用的是成骨细胞。1997 和 1998 年,美国加州分子遗传实验室的 Simonet 等^[4]和 Hus 等^[5,6]相继发现了骨保护素(osteoprotegerin, OPG)和核因子 κB 受体激活因子配体(Receptor Activator nuclear Factor Kappa B Ligand RANKL 即 osteoclast differentiation factor ODF),使人们对于破骨细胞分化成熟和活性的调控机制的认识有了巨大的进步,

作者单位:524023 湛江,广东医学院骨生物学研究室(胡彬);华中科技大学同济医学院病理教研室(吴翠环);武汉协和医院内分泌科(陈璐璐)

OPG 通过与 RANKL 结合,竞争性抑制了 RANKL 与破骨前体细胞膜上 RANK 分子的结合,从而阻断骨吸收信号的传递,抑制破骨细胞的分化、成熟,阻止骨吸收的进行^[7,8]。这些因子的基因调控很可能是调节骨重建中各组细胞的分化和活性的药物作用的靶点。本文旨在应用细胞和分子生物学的研究手段观察蛇床子素对成骨细胞分泌 OPG 和 RANKL mRNA 表达的影响了解对骨重建的作用机制,寻找药物作用的靶点及其基因调控关系,以期对蛇床子素的抗骨质疏松作用机理有深入的了解。

材料和方法

1. 实验材料

(1)动物来源:新生 24 h 内 SPF 级 SD 乳鼠由(广东医学院实验动物中心 SPF 级动物室提供(广东省动物质量合格证:2003A030;实验动物环境设施合格证:2003B012))。

(2)实验药物:蛇床子素对照品由 DELTA 天然有机化合物信息中心提供。

(3)主要器材:YJ-875 清洁超净工作台(江苏省吴江市净化设备总厂);5420-1NAPCO 二氧化碳恒温培养箱(Precision Scientific 美国);XD-101 倒置相差显微镜(江南光电股份有限公司);9600Gen Amp PCR System(PE 公司美国);DYY-5 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂);SCR-20BA 日立低温高速离心机(日立公司 日本);隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);AE240 电子天平(梅特勒-托利多公司上海分公司);752 紫外光栅分光光度计(上海第三分析仪器厂);HZS-H 水浴振荡器(哈尔滨东联电子技术开发有限公司);一次性塑料培养瓶(25 cm² Flask)(Corning Costar 公司美国);6、24、48、96 孔培养板(Corning Costar 公司 美国)。

(4)主要试剂:DMEM(H)培养液(Gibco 公司);胰蛋白酶,胶原酶 I, Triton-X 100, EB(Sigma 公司)透明质酸酶(Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)琼脂糖(西班牙分装);DMSO(Amresco 公司), Access RT-PCR 试剂盒(Promega 公司);100bp DNA Ladder, 6×上样缓冲液(华美生物工程公司);DEPC(Fluka 公司), Tris(Augus 分装),其余试剂均为国产分析纯试剂。

(5)引物设计:见表 1,所有引物经由北京华美生物技术公司合成。

表 1 RT-PCR 中应用的引物序列

Gene	Primers	扩增片段的长度 bp
OPG	Sense 5'-TCCTGGCACCTACCTAAAACAGCA-3'	578
	Antisense 5'-CTACACTCTCTGCATTCACTTTGG-3'	
RANKL	Sense 5'-CCATCGGGTTCCATAAAAGTCAGT-3'	407
	Antisense 5'-AAAGCCCCAAAGTACGTCGCATCT-3'	
β-actin	Sense 5' AACCTAAGGCCAACAGTGAAAAG 3'	240
	Antisense 5'TCATGAGCTAGTCTGTGAGGT3'	

2. 实验方法

(1)大鼠成骨细胞取材、培养及鉴定:拉颈处死乳鼠,75%酒精浸泡消毒 5 min,从鼻上部剪开皮肤,环形剪下颅骨,浸泡于 1640 液中,分离骨面软组织,剪碎颅骨至肉糜状。用 0.25% 胰蛋白酶预消化 15 ~ 20 min,再用 0.2% I 型胶原酶和 0.1% 的透明质酸酶的消化液于 50 ml 离心管中,置 37℃ 恒温水浴摇床消化,并分批收集细胞,于 CO₂ 恒温培养箱培养。经改良钙钴法^[9],ALP 染色对第二代成骨细胞鉴定。

(2)分组给药:蛇床子素结晶经 DMSO 溶解,再经培养液稀释并在用前加入胎牛血清混匀,达到合适的浓度,微孔滤膜过滤后置 4℃ 避光短期备用,含药培养液的药物终浓度分组分别如下:①正常对照:普通培养液;②溶剂对照:DMSO 0.05%;③ ~ ⑤ Os-thol 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ mol/L。连续给药 48 h,及 7 d 两天换液一次,实验重复 3 次。

(3)分离细胞提取 RNA 和质量鉴定:根据 mRNA 提取试剂盒的方法,实验过程预防 RNA 酶污染,提取 mRNA 换加 75% 乙醇-70℃ 中保存。用 752 紫外分光光度计 260/280 对 RNA 样品的浓度测定及质量鉴定。

(4)RT-PCR 反应:为比较实验两目的基因的表达比例变化同时有避免干扰,本实验采用的拟同管扩增,即以相同的模板量、相同的反应环境、相同的试剂盒和反应条件用不同的离心管对不同基因进行的转录和扩增,组成理论上与同管扩增无影响结果差别的实验条件。β-actin 反应条件也同样安排。

① RT-PCR 反应体系:见 Promega 公司试剂盒(A3500)操作手册,总反应体系量为 25 μl。

② RT-PCR 反应条件:反应条件 48℃ 逆转录 45 min, 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 sec, 60℃ 退火 1 min, 68℃ 延伸 2 min, 30 个循环,最后一个循环 68℃ 延伸 7 min。

③ 琼脂糖凝胶电泳和图象分析:从低温冰箱中取出保存的 RT-PCR 产物,置 4℃,从薄壁 EP 管中吸

取 PCR 产物,准确点样(点样包括 Marker)。上样条件:每孔上样包括目的基因 OPG 和 RANKL 产物 4 μ l,内参 β -actin 产物 2 μ l,上样缓冲液 2 μ l,混匀;电泳条件:2%琼脂糖凝胶,0.5 $\times$ TBE,pH 约为 8.5,60V 电压电泳 1.5 h,在紫外透射仪上观察、拍照。采用 Ultra-Violet Products Ltd. 公司(Cambridge UK)的 BioImaging Systems Labworks (Version 4.0)软件对琼脂糖凝胶电泳条带图片进行光密度分析,目的条带的光密度积分值 V 值(V = 平均吸光度值 $\times$ 条带面积);计算 V_{OPG}/V_{RANKL} 光密度积分值的比率(Ratio);各样品的目的基因的表述强度 R_v 值: $OPG R_v = V_{OPG}/V_{\beta-Actin}$, $RANKL R_v = V_{RANKL}/V_{\beta-Actin}$ 。

④Rt-PCR 产物测序:为验证目的基因的 RT-PCR 产物的正确性,随机选取 OPG 和 RANKL 的 RT-PCR 产物一份送上海生工生物工程技术有限公司(测序部)测序。

(5)统计学方法:将所得数据输入计算机分析系统,应用 SPSS11.0 软件,RT-PCR 的结果计算其相对

值观察趋势,分别得出的数据处理均采用 One-Way ANOVA 检验,统计软件为 SPSS 11.0。

结 果

1. 成骨细胞的总 mRNA 的浓度检测和质量鉴定

提取成骨细胞的总 mRNA,经用 752 紫外分光光度计 A260/A280 测定,所有的样品的 mRNA 值均在 1.78 ~ 2.0 之间。提取总 RNA 1 μ g,经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析,电泳结束后,在紫外灯下观察有两条带,提示未有降解。

2. 成骨细胞 OPG 及 RANKL 测序

RT-PCR 产物正向测序结果和大鼠基因库中 OPG 和 RANKL cDNA 链基本相符,说明本文中 RT-PCR 产物确为小鼠 OPG 和 RANKL 的 cDNA。

3. 蛇床子素对成骨细胞 OPG 及 RANKL 的 mRNA 表达的影响

成骨细胞 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 1、2,PCR 产物 R_v 和 V_{OPG}/V_{RANKL} 光密度积分值比值见表 2、3。

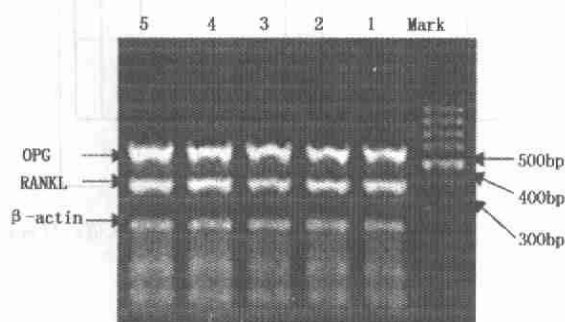


图 1 实验 48 h OPG 和 RANKL mRNA 表达

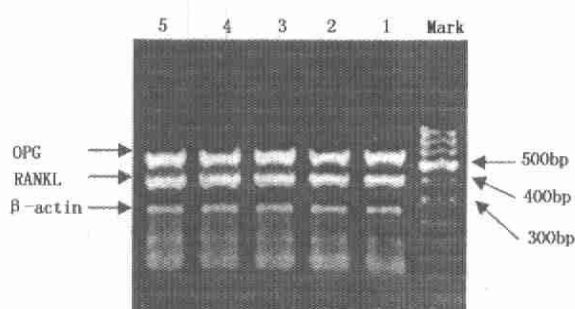


图 2 实验 7 d OPG 和 RANKL mRNA 表达

注:Mark 是 100 bp 的 DNA Ladder,1 为空白对照组,2 为溶剂对照组,3、4、5 分别对应的是蛇床子素 Ost 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} mol/L

表 2 实验 48 h 和 7 d 各组目的条带吸光度 R_v 值($n=5, \bar{x} \pm s$)

时间	项目	Control	DMSO	OST 10^{-7} mol/L	OST 10^{-6} mol/L	OST 10^{-5} mol/L
48 h	OPG	3.070 $\pm$ 0.23	3.194 $\pm$ 0.41	3.748 $\pm$ 0.33**	3.709 $\pm$ 0.45*	3.954 $\pm$ 0.36**
	RANKL	0.924 $\pm$ 0.32	0.920 $\pm$ 0.19	0.890 $\pm$ 0.41	0.909 $\pm$ 0.29	0.892 $\pm$ 0.27
7 d	OPG	5.978 $\pm$ 0.56	6.060 $\pm$ 0.91	8.769 $\pm$ 0.66**	8.755 $\pm$ 0.89**	9.582 $\pm$ 1.55**
	RANKL	2.590 $\pm$ 0.33	2.612 $\pm$ 0.64	2.492 $\pm$ 0.38	2.390 $\pm$ 0.31	2.291 $\pm$ 0.29*

注:与同时时间的 control 组比较 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

表 3 实验 48 h 和 7 d 各组 V_{OPG}/V_{RANKL} 光密度积分值的比值($n=5, \bar{x} \pm s$)

项目	Cont	DMSO	Ost L	Ost M	Ost H
V_{OPG}/V_{RANKL} 48h	3.32 $\pm$ 0.28	3.47 $\pm$ 0.29	4.21 $\pm$ 0.52	4.08 $\pm$ 0.49	4.43 $\pm$ 0.21**
V_{OPG}/V_{RANKL} 7 d	2.31 $\pm$ 0.18	2.32 $\pm$ 0.15	3.52 $\pm$ 0.43**	3.66 $\pm$ 0.17*	4.18 $\pm$ 0.61**

注:与同时时间的 control 组比较 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

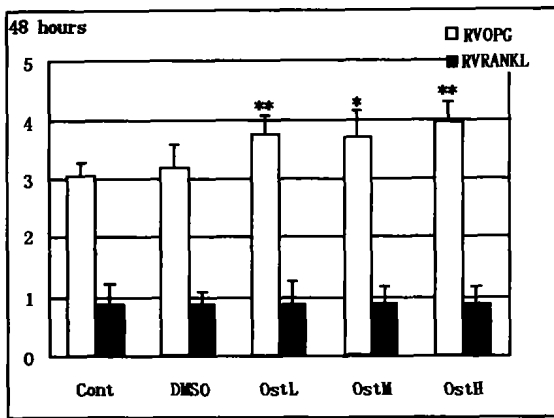


图3 培养 48 h OST 对成骨细胞 OPG 和 RANKL 基因 mRNA 表达的影响(RV 值)。与 control 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

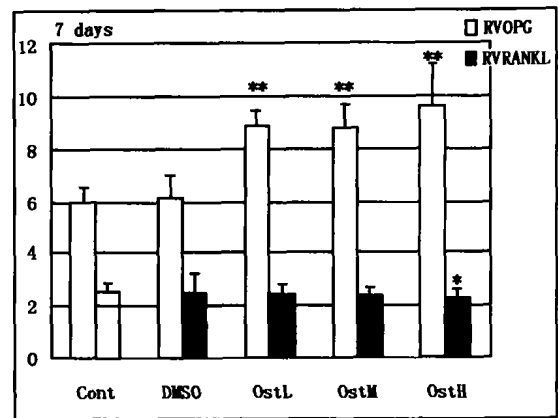


图4 培养 7 d 时 OST 对成骨细胞 OPG 和 RANKL 基因 mRNA 表达的影响(RV 值)。与 control 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

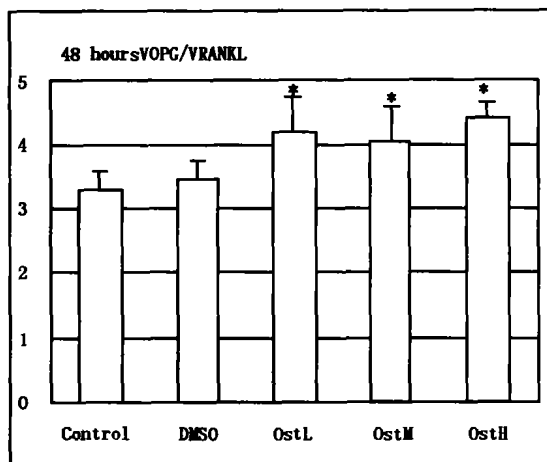


图5 培养 48 h 成骨细胞 V_{OPG}/V_{RANKL} 光密度积分值的比值。与 control 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

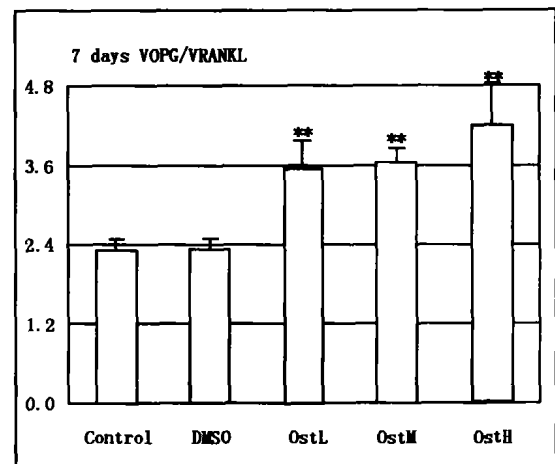


图6 培养 7 d 成骨细胞 V_{OPG}/V_{RANKL} 光密度积分值的比值。与 control 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

由表 2,3 可见,含药培养液对细胞培养 48 h, OPG RANKL 及 β -actin 的 mRNA 都已有表达,相对空白对照组,OST 增强了 OPG mRNA 的表达 ($P < 0.05$),但对 RANKL 的表达无显著影响,见图 3; OPG/RANKL 比值变大,见图 5;当培养 7 d 时 OPG 和 RANKL mRNA 的表达都有增加,OST 在不同浓度上都增强了 OPG 的表达 ($P < 0.01$),OST 在 10^{-5} mol/L 浓度时抑制了 RANKL 的表达 ($P < 0.05$) 见图 4, OPG/RANKL 比值增大,见图 6。

讨 论

正常状况下骨代谢是由骨吸收和骨形成维持着动态平衡的,绝经后骨代谢呈骨高转换的改变,即骨吸收和骨形成都增强,但由于前者作用大于后者,骨转换增多只能造成骨量丢失得越多,是绝经后骨质减少的直接原因。因此在防治骨质疏松症的药物的研究上常常围绕在研究药物对骨转换的影响这一角

度。动物实验证实中药蛇床子及其组方和主要成分有明显降低骨高转换的作用^[10],不同的学者也都在不同的研究中发现蛇床子素的抑制骨吸收的作用,OST 能降低去卵巢大鼠反映骨吸收的骨代谢生化指标尿 DPD (urinary deoxypyridinoline)^[11],也能降低大鼠骨组织形态计量学有关骨吸收的参数^[12]。

在骨吸收的过程中处于中心环节是破骨细胞的分化和成熟。目前已经证明多种激素和局部作用因子如活性维生素 D_3 [$1,25(OH)_2D_3$]、糖皮质激素、甲状旁腺素 (PTH)、前列腺素 (PGE_2)、 $IL_{4,6,11,12}$ 等不仅能调节破骨细胞功能还能调节破骨细胞功能。但这些因子主要作用于成骨细胞或骨髓基质细胞,调节护骨素 (osteoprotegerin, OPG) 和核因子 κB 受体激活因子配体 (RANKL, Receptor Activator nuclear Factor Kappa B Ligand) 等。破骨细胞的分化和成熟与 RANKL 和破骨细胞前体细胞膜表面的 RANK 结合直接相关。而 RANKL 是由成骨细胞和其它细胞分泌的,

同时成骨细胞分泌的 OPG 可以和 RANKL 结合从而竞争性阻滞了 RANK 与 RANKL 结合,达到调控 OC 分化和功能作用。由此,成骨细胞表达 OPG 和 RANKL 的比例可能是调节破骨细胞的关键因素^[13], Asami 等学者^[14]发现小鼠去卵巢后 RANKL 表达升高,而 OPG 表达下降。OPG 和 RANKL 主要由成骨细胞和骨髓基质细胞分泌,调控二者的表达水平就决定了对破骨细胞的调控方向。

简单而言影响骨吸收的是破骨细胞,但掌握调控破骨细胞的分化和成熟的关键却是成骨细胞和基质细胞。因此本研究在选题时着重讨论蛇床子素影响成骨细胞对调控破骨细胞的中心途径,即检测对 OPG 和 RANKL 的 mRNA 表达的影响,从而从该角度阐明蛇床子素对骨代谢作用的机理。

我们的研究发现在加药对成骨细胞影响 48 h,即可以观察到两基因都已有表达,相对空白对照组,OST 上调 OPG mRNA 的表达 ($P < 0.05$),但对 RANKL 的表达无显著影响,但 OPG/RANKL 比值已经较正常空白对照组变大,对破骨细胞已经有明显的抑制作用;7 d 时 OPG 和 RANKL 表达都有增加,OST 上调 OPG 的表达 ($P < 0.01$),OST 在 10^{-5} mol/L 下调 RANKL 的表达 ($P < 0.05$),而在 OST 的低浓度 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L 观察到对 RANKL 有降低表达的趋势,各浓度的 OST 都使 OPG/RANKL 比值较空白对照组增大,提示了蛇床子素可能抑制破骨细胞的分化、成熟的作用,OC 的生成减少,活性减弱,从而抑制骨吸收。本实验中的 OPG 表达量变化幅度不大,以及 RANKL 表达存在变化的趋势但无显著性,可能与实验时间因素有关,OPG 和 RANKL 都未达到表达的高峰。

综上所述,在本研究中发现 OST 可以主要上调大鼠成骨细胞中 OPG 基因的表达,同时轻微降低 RANKL 的表达,提高 OPG/RANKL 的比率,继而达到抑制 OC 的分化和活性,使骨吸收降低,进一步证实其有抑制破骨细胞骨吸收的作用。在其早期无明显的改变和趋势。但本研究仅仅是利用 RT-PCR 对几种因子在转录水平的检测,至于两种组织中每种因

子 mRNA 表达量的确切变化、蛋白水平的情况及每种因子在组织中的具体定位有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 张新勇,向仁德. 蛇床子化学成分的研究. 中草药,1997,28:588.
- 2 李朝阳,吴铁,李育南,等. 蛇床子总香豆素与尼尔雌醇对去卵巢大鼠骨代谢的影响. 中国药理学报,1997;18:286-288.
- 3 Terence JW. Changing perceptions in osteoporosis. British Medicine Journal, 2001, 49: 256-260.
- 4 Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell, 1997, 87 (2):309-319.
- 5 Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANKL mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 3540-3545.
- 6 Aubin JE, Bonnelly E. Osteoprotegerin and its Ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. Osteoporosis international, 2000, 11: 905-913.
- 7 Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell, 1998, 93(2): 165-176.
- 8 Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 253(2):395-400.
- 9 王洪复主编. 骨细胞图谱与骨细胞体外培养技术. 上海:上海科学技术出版社, 2001:62.
- 10 Li QN, Liang NC, Wu T, et al. Effects of total coumarins of Fructus Cnidii on ovariectomized rats. Acta pharmacologica Sinica, 1994, 15: 528-532.
- 11 Li Xiaoxia, Hara Ichie, Matsumiya Teruhiko. Effects of Osthole on postmenopausal osteoporosis using ovariectomized rats; comparison to the effects of estradiol. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25(6): 738-742.
- 12 李朝阳. 蛇床子素对去卵巢大鼠近侧胫骨代谢影响的定量研究. 药学报, 1996, 31(5):327-332.
- 13 Thomas GJ, Baker SUK, Eisman JA, et al. Changing RANKL/OPG mRNA expression in differentiating murine primary osteoblasts. J Endocrinol, 2001, 170:451-460.
- 14 Asami T, Inada M, Mizunuma H, et al. Expression of osteoblast differentiation factor (ODF/RANKL/OPGL) in trabecular bone and bone marrow B-Lymphocytes in OVX mice. J Bone Miner Res, 1999, 14(Suppl 1):1079.
- 18 Jan O. Gordeladze, Janne ER, et al. Pharmacological interference with transcriptional control of osteoblasts: A possible role for leptin and fatty acids in maintaining bone strength and bone lean mass. Curr Pharm Des, 2001, 7:275-290.
- 19 Manolagas SC. The role of IL-6 type cytokines and their receptor in bone. Ann N Y Acad Sci, 1998, 840: 194-204.

(收稿日期:2004-05-10)

(上接第 431 页)

2001, 7:275-290.

- 16 Gordeland JE, Syversen U, Bakke I, et al. 2001 a, J Cell Biochem, in press.
- 17 Steppan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, et al. Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. Regul Pept, 2000, 92: 73-78.

(收稿日期:2003-11-05)