DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.13.011
第26卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 13
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)13-1155-04

论著

雌二醇对骨髓基质细胞向成骨细胞分化的影响

袁成良[1],金小岚[1],侯建红[2],栗群英[3],黄迎春[4] (成都军区总医院:[1]内分泌科,[2]神经外科,[3]检验科,成都 610083;[4]成都百奥生物技术有限公司,成都 610026)

提 要:目的 研究骨髓基质细胞在向成骨细胞分化的介质中,17β-雌二醇(E2)对其骨形态发生蛋白受体(BMPR)ⅠA及核结合因子α1(Cbfα1)mRNA表达的影响,探讨雌二醇对成骨细胞生成的作用。方法 用1,25-$(OH)_2D_3$和地塞米松(DEX)诱导大鼠骨髓基质细胞向成骨细胞分化,应用RT-PCR和Northern blot技术,观察不同浓度E2对骨髓基质细胞分化过程中BMPR-ⅠA及Cbfα1 mRNA表达的影响,以α-磷酸奈酚为底物测定细胞碱性磷酸酶的活性,Van Gieson染色法显示Ⅰ型胶原的含量。结果 E2能明显抑制骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程中BMPR-ⅠA及Cbfα1 mRNA的表达,且呈剂量依赖性,并被Northern blot结果所证实。ALP活性随E2浓度增加而降低,细胞Ⅰ型胶原的合成量随E2浓度增加而减少。结论 E2能明显抑制体外培养的骨髓基质细胞分化过程中BMPR-ⅠA及Cbfα1 mRNA的表达,降低成骨细胞生成。

关键词:雌二醇;骨髓基质细胞;骨形态发生蛋白受体ⅠA;分化;核结合因子α1
中图法分类号:R322.71;R329.24;R977.12 文献标识码:A

Effects of 17β-estradiol on the gene expression of BMPR-Ⅰ A and Cbfα1 in bone marrow stromal cells

YUAN Cheng-liang[1], JIN Xiao-lan[1], HOU Jian-hong[2], LI Qun-ying[3], HUANG Yin-chun[4] ([1] Department of Endocrinology, [2]Department of Neurosurgery, [3] Department of Medical Laboratory, General Hospital, Chengdu Military Area Command, Chengdu 610083; [4]Chengdu Baiao Bio-Tech Limited Company, Chengdu 610026, Sichuan Province, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of 17β-estradiol (E2) on the gene expression of type Ⅰ A bone morphogenetic protein receptor (BMPR-Ⅰ A) and core-binding factor alpha 1 (Cbfα1) in rat bone marrow stromal cells exposed to the differentiation medium and to elucidate the effects of E2 on osteoblastogenesis. **Methods** Adherent bone marrow stromal cells were cultured in differentiation medium containing DEX (10^{-7} mol/L), 1,25-(OH)2D3 (10^{-9} mol/L) and different concentrations of E2. Effects of different concentrations of E2 on the gene expression of BMPR-Ⅰ A and Cbfα1 was quantified by RT-PCR based on the comparison with an internal reference, β-actin expression, and identified by Northern blotting. Alkaline phosphatase (ALP) activity of cells was detected. Contents of type Ⅰ collagen were determined by Van Gieson staining. **Results** E2 could evidently inhibit the expression of BMPR-Ⅰ A and Cbfα1 mRNA during the differentiation process of bone marrow stromal cells into osteoblasts in a dose-dependent manner. These were confirmed by Northern blotting. The ALP activity increased in a concentration-dependent manner, but the amount of type Ⅰ collagen decreased in a concentration-dependent manner. **Conclusion** E2 can significantly inhibit the gene expression of BMPR-Ⅰ A and Cbfα1 in bone marrow stromal cells and inhibit osteoblastogenesis *in vitro*.

Key words: 17β-estradiol; bone marrow stromal cell; bone morphogenetic protein receptor Ⅰ A; differentiation; core binding factor alpha 1

骨形态发生蛋白受体Ⅰ(bone morphogenetic protein receptorⅠ,BMPR-Ⅰ)有两个亚型即BMPR-ⅠA,ⅠB,属丝氨酸-苏氨酸激酶受体,它们与其配体结合,通过TGF-β超家族信号传递分子(signal-transducing molecules of the TGF-β superfamily, Smads)传递分化信号,调节骨髓基质细胞向成骨细胞(osteoblast, OB)或脂肪细胞分化[1,2]。成骨细胞是由具有多向分化潜能的骨髓基质细胞(marrow stromal cells, MSCs)在特定的转录因子诱导下分化而来的。核结合因子α1(core binding factor α1,Cbfα1)是成骨细胞分化的关键性转录因子。因此

作者简介:袁成良(1970-),男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事绝经后骨质疏松的细胞、分子机制方面的研究。电话:(028)86570472
通信作者:金小岚,电话:(028)86570206
收稿日期:2003-03-04;修回日期:2003-09-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

BMPR-ⅠA及Cbfα1与骨代谢密切相关。绝经后骨质疏松的病理生理机制尚未完全阐明，许多研究表明雌激素缺乏可导致成骨细胞生成增多，继而诱导破骨细胞生成并增强其功能。雌二醇(estradiol，E2)影响成骨细胞生成的分子机制尚不完全明了，尤其是E2对BMPR及Cbfα1的作用知之甚少。本实验探讨E2对大鼠骨髓基质细胞在向成骨细胞分化过程中BMPR-ⅠA及Cbfα1 mRNA表达的影响，揭示E2对成骨细胞生成的作用，试图阐明绝经后高转换骨代谢的可能机制。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

DMEM培养基(Hyclone)，小牛血清(郑州佰安生物制品有限公司)，1，25-$(OH)_2$ vitamin D_3和E2(Sigma)，地塞米松(徐州莱恩药业有限公司)，RT-PCR试剂盒与RNA提取试剂盒(大连宝生物)，Northern blot增强化学发光试剂盒(PIERCE)，CO_2孵箱(Forma Scientific)，倒置显微镜(Coic)，Beckman CX7生化分析仪(美国)，紫外可见分光光度计(日本岛津)，电泳仪(北京六一仪器厂)，大容量PCR扩增仪(美国)，Cliniscan2图像分析系统(美国)，引物用Jellyfish软件设计，由大连宝生物技术有限公司合成，大鼠BMPR-ⅠA扩增cDNA后产物长度为580 bp，其引物为：5′-TCGTTACAACCGTGACTTGG-3′，5′-ATTTAACAGCTAGGCCCAG G-3′。大鼠Cbfα1扩增cDNA后产物长度为261 bp。引物：5′-AT GCTTCATTCGCCTCACAAAC-3′，5′-CCAAAAGAAGCTTTGCTG-3′。用β-肌动蛋白(β-actin)基因cDNA 313 bp作内对照，引物为：5′-GACTACCTCATGAAGATCCT-3′，5′-GCGGATGTCCACGTCACACT-3′。

1.2 大鼠骨髓基质细胞的分离培养

3月龄雌性SD大鼠，体质量(200±20)g，购于成都中医药大学实验动物研究中心。二氧化碳窒息大鼠，于75%乙醇中消毒，无菌条件下分离大鼠股骨，去除软组织，切除骨骺端，用5 ml DMEM培养液冲出骨髓，悬浮细胞，1 000 r/min离心10 min，弃上清，DMEM洗涤2次，用含20%小牛血清、10^5 U/L青霉素和10^5 U·L^{-1}链霉素的DMEM 3 ml制成细胞悬液，血细胞计数板计数，以每瓶10^7 cells接种于25 ml培养瓶。37 ℃，5% CO_2，静置培养，3 d后换液，弃悬浮细胞，10 d以0.25%胰蛋白酶消化传代，接种密度每瓶10^5 cells，(3～4) d融合后传代。

1.3 骨髓基质细胞的诱导分化[3]

在生长培养基中传代的大鼠骨髓基质细胞，用1，25$(OH)_2D_3$(10^{-9} mol/L)和地塞米松(dexamethasone，DEX)(10^{-7} mol/L)诱导其向成骨细胞分化。根据E2的不同浓度分为4组，E2的浓度分别为(0，10^{-10}，10^{-8}和10^{-6})mol/L。3 d后进行下面的实验，每项实验样本数为4。

1.4 ALP活性测定

将培养细胞用PBS冲洗2次，Tris-Triton X-100(50 mmol/L Tris，2 mmol/L $MgCl_2$，150 mmol/L NaCl，1% Triton X-100)缓冲液加超声粉碎裂解细胞，裂解产物离心后取上清液，以α-磷酸奈酚为底物，在Beckman CX-7生化分析仪上测定碱性磷酸酶(alkaline phosphatase，ALP)的活性，其活性用国际单位(U)表示(即：在规定条件下，每分钟催化1 μmol底物产生反应的酶量)。钨酸比浊法测定裂解液蛋白含量，以校正因细胞数不同引起的ALP活性差异。

1.5 Van Gieson染色

10%中性甲醛固定培养于24孔板的骨髓基质细胞，蒸馏水冲洗，Weigert苏木素染液染色10 min，自来水冲洗，0.5%盐酸乙醇分化，Van Gieson染色，95%乙醇分化脱水，二甲苯透明，显微镜观察并照相。

1.6 RT-PCR

采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取RNA，紫外分光光度计测定总RNA浓度，A_{260}/A_{280}均在1.8～2.0。采用一步法使逆转录反应与cDNA扩增在同一反应管中进行，反应体系为：每管总RNA 1 μg，10× RT-PCR缓冲液5 μl，25 mmol/L $MgCl_2$ 10 μl，10 mmol/L dNTP 5 μl，4× 10^7 U/L RNA酶抑制剂、5× 10^6 U/L *Taq* DNA聚合酶、5× 10^6 U/L逆转录酶、上下游引物(20 mmol/L)各1 μl，无菌DEPC水补充反应体积至50 μl。50 ℃ 30 min进行逆转录反应，然后94 ℃变性2 min，进入扩增，扩增条件为：94 ℃变性45 s，60 ℃退火1 min，72 ℃延伸90 s，35个循环后72 ℃延伸反应增加10 min。β-actin循环数为25，其余参数同上。

取扩增产物10 μl与溴酚蓝上样缓冲液2 μl混合后行1%琼脂糖凝胶电泳，溴乙锭染色，紫外灯下观察并成像。扩增后β-actin cDNA长313 bp，BMPR-ⅠA cDNA长580 bp，Cbfα1 cDNA长261 bp。凝胶成像分析系统(UVI photo MV)分析图像，BMPR-ⅠA和Cbfα1表达量用扩增产物相应条带的光密度值与β-actin条带光密度值之比值表示。

1.7 Northern blot

mRNA的甲醛变性胶电泳：在一微量离心管中加入RNA 4.5 μl，5× 甲醛胶电泳缓冲液2.0 μl，37% 甲醛3.5 μl，甲酰胺10.0 μl，置65 ℃保温15 min，然后迅速置冰浴中，稍离心，加入2.0 μl载样缓冲液，上样前凝胶预电泳5 min，上样，恒压4 V/cm电泳2 h。电泳结束后将凝胶中的mRNA经电转印至尼龙膜上。预杂交和杂交：将等量直接杂交缓冲液1和2混合，并预热至55 ℃，将混合液加入装有尼龙膜的塑料袋中，55 ℃杂交15 min，预杂交后将尼龙膜放入另一塑料袋中，加入含HRP标记的探针(8 ng/ml)，封口，于55 ℃杂交1.5 h。洗涤：杂交结束后，将尼龙膜转入清洗液(2× SSC/0.1% SDS)中于55 ℃清洗3× 5 min后，在室温下用2× SSC液清洗3× 5 min。底物反应：将等量增强化学发光试剂与过氧化物酶底物溶液混合，加于膜上，室温孵育5 min，弃反应液，用保鲜膜将尼龙膜包好，置暗盒中，放上X线片，曝光1 min，并进行常规显影、定影。用Cliniscan2图像分析系统测定各条带的相对光密度值。

1.8 统计学处理

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，用SPSS9.0软件进行方差分析。

2 结果

2.1 ALP活性

传代的骨髓基质细胞在分化培养基中培养3 d，不同浓度E2条件下细胞均能产生碱性磷酸酶(alkaline phosphatase，ALP)，

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

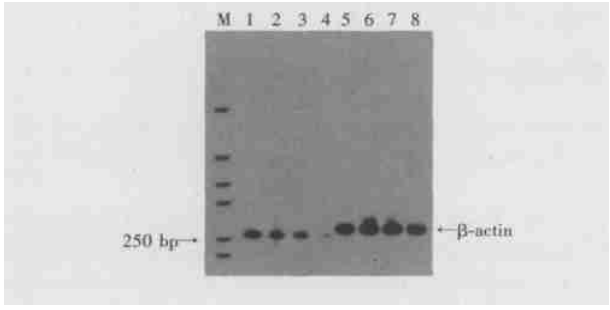
其活性随 E2 浓度增加而降低, E2 浓度为(0, 10^{-10}, 10^{-8} 和 10^{-6})mol/L 时, ALP 活性分别为(42.6±2.5, 17.9±2.0, 10.8±1.5 和 3.6±0.7)U/g (protein)($P<0.01$)。

2.2 Van Gieson 染色

传代的骨髓基质细胞在分化培养基中培养 3 d, 用 Van Gieson 染色细胞, 随着 E2 浓度的增加, 胞浆染色越淡, 由鲜红、淡红到黄色。胞浆呈红色说明有胶原合成, 红色越深, 表明胶原越多。

2.3 E2 对 BMPR-Ⅰ A 及 Cbfα1 mRNA 表达的影响

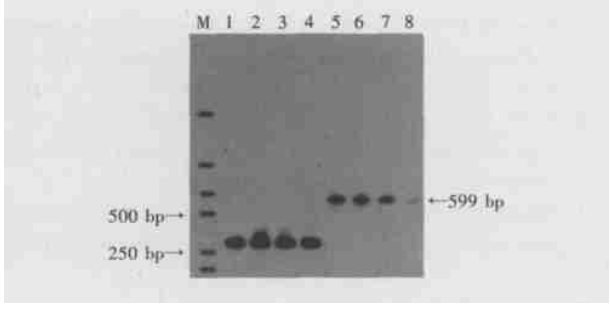
在含 1, 25(OH)$_2$D$_3$ 和 DEX 的分化培养基中, E2 能明显抑制骨髓基质细胞 BMPR-Ⅰ A 及 Cbfα1 mRNA 的表达, 随 E2 浓度的增高, BMPR-Ⅰ A 及 Cbfα1mRNA 的表达量递减, 这种抑制作用有剂量依赖性(表 1, 图 1、2)。RT-PCR 的结果被 Northern blot 所证实: BMPR-Ⅰ A mRNA 为 2.49 kb, Cbfα1mRNA 为 1.39 kb, 在 X 线片上有相应 kb 的条带出现, 表明 RT-PCR 不存在假阳性, 而且各条带的相对光密度值也随 E2 浓度的增加而降低(表 2, 图 3、4)。



M: Marker; 1～4: Cbfα1 mRNA expression of cells affected by E2 in concentration of 0, 10^{-10}, 10^{-8} and 10^{-6} mol/L; 5～8: β-actin mRNA expression in the same model as those in 1～4

图 1　**E2 对骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程中 Cbfα1 mRNA 表达的影响(RT-PCR)**

Fig 1　Effect of E2 on expression of Cbfα1 mRNA in bone marrow stromal cells (RT-PCR)



M: marker; 1～4: BMPR-Ⅰ A mRNA expression of cells affected by E2 in concentration of 0, 10^{-10}, 10^{-8} and 10^{-6} mol/L; 5～8: β-actin mRNA expression in the same model as those in 1～4

图 2　**E2 对骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程中 BMPR-Ⅰ A mRNA 表达的影响(RT-PCR)**

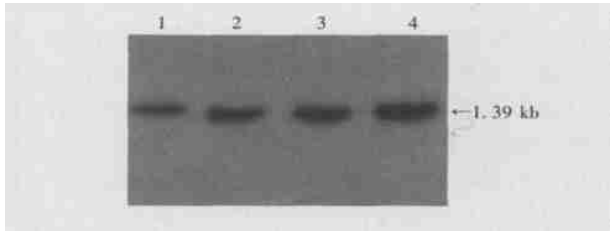
Fig 2　Effects of E2 on expression of BMPR-Ⅰ A mRNA in bone marrow stromal cells (RT-PCR)

表 1　**E2 对骨髓基质细胞分化过程中 BMPR-Ⅰ A, Cbfα1mRNA 表达的影响(RT-PCR)($\bar{x}\pm s$)**

Tab 1　RT-PCR analysis of the effects of E2 on the expression of BMPR-Ⅰ A, Cbfα1 mRNA in bone marrow stromal cells during differentiation (RT-PCR) ($\bar{x}\pm s$)

E2(mol/L)	n	BMPR-Ⅰ A/β-actin(%)	Cbfα1/β-actin(%)
0	4	27.0±3.4	25.0±3.3
10^{-10}	4	22.3±2.6 *	19.8±2.2 *
10^{-8}	4	17.0±1.8 **	14.5±1.3 **
10^{-6}	4	9.3±2.8 **	6.5±1.9 **

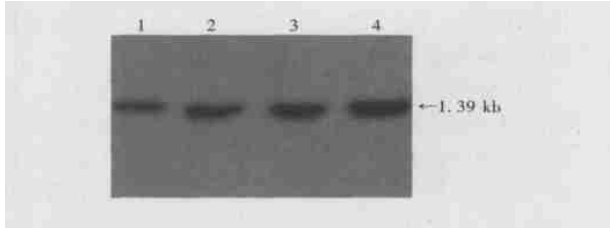
*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* E2 0



1～4: Cbfα1 mRNA expression of cells affected by E2 in concentration of 0, 10^{-10}, 10^{-8} and 10^{-6} mol/L

图 3　**E2 对骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程中 Cbfα1 mRNA 表达的影响(Northern blot)**

Fig 3　Effects of E2 on expression of Cbfα1 mRNA in bone marrow stromal cells (Northern blot)



1～4: BMPR-Ⅰ A mRNA expression of cells affected by E2 in concentration of 0, 10^{-10}, 10^{-8} and 10^{-6} mol/L

图 4　**E2 对骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程中 BMPR-Ⅰ A mRNA 表达的影响(Northern blot)**

Fig 4　Effects of E2 on expression of BMPR-Ⅰ A mRNA in bone marrow stromal cells (Northern blot)

表 2　**E2 对骨髓基质细胞分化过程中 BMPR-Ⅰ A, Cbfα1mRNA 表达的影响(Northern blot)($\bar{x}\pm s$)**

Tab 2　Northern blot analysis of the effects of E2 on the expression of BMPR-Ⅰ A and Cbfα1 mRNA in bone marrow stromal cells during differentiation (Northern blot) ($\bar{x}\pm s$)

E2(mol/L)	n	BMPR-Ⅰ A	Cbfα1
0	4	4.22±0.11	4.41±0.12
10^{-10}	4	2.73±0.08 **	2.51±0.12 **
10^{-8}	4	1.89±0.10 **	1.88±0.10 **
10^{-6}	4	1.17±0.09 **	1.19±0.10 **

**: $P<0.01$, *vs* E2 0

3　讨论

骨形态发生蛋白及其受体是成骨细胞分化成熟的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

重要调节因子。BMPs与BMPRs结合，通过Smads传递分化信号，促进多能干细胞和骨髓基质细胞向成骨细胞或脂肪细胞分化。BMP2和BMP4与多能间质细胞系C3H10T1/2细胞表面的BMPR不同亚型结合，介导其分化为成骨细胞或脂肪细胞。为了深入了解BMPR-Ⅰ不同亚型的生理功能，定点突变或酶切失活的的BMPR-Ⅰ成功地运用于BMP介导细胞分化信号传递的研究，结果表明缺少跨膜区和胞内区的可溶性BMPR-ⅠA与其配体结合，拮抗BMP的作用[4]；定点突变或酶切失活的BMPR-Ⅰ能阻断BMPs的活性；持续活化的BMPR在无配体作用下也能传递BMP的信号，促使细胞向成骨细胞或脂肪细胞分化；在MC3T3-E1中表达显性失活的BMPR-ⅠA，该细胞对外源性BMP2和BMP4的刺激无反应，而且在β-甘油磷酸盐和抗坏血酸作用下不形成骨结节[5]。可见BMPR在BMP介导的细胞分化中发挥重要作用。本实验结果显示E2能明显抑制BMPR-ⅠA mRNA的表达，且有剂量依赖性。ALP与Ⅰ型胶原是成骨细胞分化成熟的标志，随着E2浓度的增加，ALP活性降低，Ⅰ型胶原合成减少，表明E2抑制骨髓基质细胞向成骨细胞分化。本实验结果提示：BMPR-ⅠA表达增加有利于骨髓基质细胞向成骨细胞分化，E2可能通过抑制BMPR-ⅠA mRNA的表达而降低骨髓基质细胞向成骨细胞分化。

成骨细胞的分化成熟在骨代谢中有重要意义。核结合因子通过调节生长因子和骨特异性细胞外基质蛋白基因表达参与成骨细胞的分化和骨发育，是成骨细胞分化的关键性转录因子。在非成骨系细胞中超表达Cbfα1，可介导这些细胞表达成骨细胞特异性基因。Cbfα1的反义核苷酸可下调成骨细胞相关基因mRNA的表达，抑制成骨细胞分化和骨结节的形成。Cbfα1基因缺失或突变的小鼠其胚胎骨骼发育过程中软骨内成骨和膜内成骨均被终止。ALP和Ⅰ型胶原是成骨细胞分化成熟的标志。本实验结果显示E2能明显抑制Cbfα1 mRNA的表达、ALP活性和Ⅰ型胶原合成，且有剂量依赖性，表明E2抑制骨髓基质细胞Cbfα1 mRNA的表达，降低其向成骨细胞分化。

BMPR-ⅠA是BMP2和BMP4的主要受体，它们结合后刺激成骨细胞特异性转录因子Cbfα1的表达。Cbfα1不仅在成骨细胞分化成熟中起关键作用，而且还调节破骨细胞的分化成熟及其活性。Cbfα1缺失小鼠破骨细胞生成明显不足。对成骨/基质细胞诱导前破骨细胞分化分子机制的研究表明前者产生的RANKL是调节后者分化的关键因子[6]。后来证实了在RANKL基因中有两个功能性Cbfα1结合位点，这两个位点发生突变，RANKL启动子失去转录活性，说明Cbfα1可能直接调节了RANKL的生成。E2通过抑制Cbfα1的表达来调节RANKL的表达，从而降低骨髓基质细胞向成骨细胞分化，减少支持破骨细胞（osteoclast，OC）分化的细胞的形成，进而调控OC的生成及活性。绝经后雌激素分泌迅速减少，骨髓基质细胞BMPR-ⅠA mRNA表达增强，使其向成骨细胞分化增加，继而诱导OC生成增多，使参与骨再建的基本多细胞单位（basic multicellular unit，BMU）的细胞得到过量补充或形成新的BMU参与骨再建，从而产生高转换骨代谢，骨量丢失增加，最终导致骨质疏松。

骨髓基质细胞具有多向分化潜能，在一定条件下可定向分化为成骨细胞、肌细胞、神经细胞[7,8]和脂肪细胞[9]。本研究结果表明：抑制骨髓基质细胞BMPR-ⅠA和/或Cbfα1 mRNA的表达，降低其向成骨细胞分化，重建OB与OC的偶联平衡，降低骨转换，可作为防治绝经后骨质疏松药物开发的新靶点。

参考文献：

[1] Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins[J]. Cytokine Growth factor Rev, 1998, 9(1): 49—61.

[2] Gori F, Thomas T, Hicok K C, *et al*. Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enshances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation[J]. J Bone Miner Res, 1998, 14(4): 1522—1535.

[3] Gori F, Hofbauer L C, Dunstan C R, *et al*. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated[J]. Endocrinolgy, 2000, 141(12): 4768—4776.

[4] Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1[J]. Endocr Rev, 2000, 21(4): 393—411.

[5] Suzawa M, Takeuchi Y, Fukumoto S, *et al*. Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells *in vitro*[J]. Endocrinology, 1999, 140(5): 2125—2133.

[6] Wei S, Teiteibaum S L, Wang M W, *et al*. Receptor activator of nuclear factor-kB ligand activates nuclear factor-kB in osteoclast precursors[J]. Endocrinology, 2001, 142(3): 1290—1295.

[7] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143—147.

[8] Makino S, Fukuda K, miyoshi S, *et al*. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*[J]. J Clin Invest, 1999, 103(5): 697—705.

[9] 项 鹏，张丽蓉，陈振光，等. 成人骨髓间质干细胞定向诱导为脂肪细胞的研究[J]. 中国病理生理杂志，2001，17(7)：598—601.

（编辑 薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net