

金雀异黄素抑制 IL-1 α 刺激破骨样细胞的组织蛋白酶 K 表达

王运林* 刘晓晴 杨菲 姚汉华 汪红兵 夏秦 朱欢丽

(华中科技大学附属同济医院老年科, 武汉 430030)

摘要 从人骨巨细胞瘤组织中纯化破骨样细胞, 用不同浓度的金雀异黄素温育 48 h, 观察 IL-1 α 刺激后 1 h 后组织蛋白酶 K 表达。结果发现: 与阴性对照组相比, IL-1 α 明显刺激破骨样细胞表达组织蛋白酶 K ($P < 0.01$); 而金雀异黄素抑制 IL-1 α 刺激后组织蛋白酶 K 转录及表达, 且呈剂量依赖关系 ($P < 0.01$); 加用雌激素受体拮抗剂 ICI 182.780 后, 金雀异黄素作用被部分拮抗。金雀异黄素通过雌激素受体部分抑制 IL-1 α 刺激破骨样细胞的组织蛋白酶 K 表达。

关键词 金雀异黄素; 人破骨样细胞; 组织蛋白酶 K; IL-1 α

破骨细胞在骨重塑过程中具有十分重要的作用, 并受到骨组织微环境因素的调控; 成骨细胞以及骨基质细胞旁分泌 IL-1 α 、TNF- α ^[1]、M-CSF、OPG 和 RANKL^[2], 共同调节破骨细胞的分化及活性, 雌激素缺乏情况下, IL-1 α 、TNF- α 、RANKL 等细胞因子分泌明显增加^[3], 这些细胞因子增加破骨细胞的溶骨活性, 造成骨量丢失, 临床上采用雌激素替代治疗可以预防和治疗绝经后骨质疏松。但长期雌激素替代治疗也可能诱发乳腺癌等一系列问题。

Brzezinski 等^[4]指出, 植物雌激素是一种天然的选择性雌激素受体调节剂, 它具有雌激素和抗雌激素作用, 对骨组织表现出雌激素样作用, 增加骨密度。动物实验表明, 植物雌激素——金雀异黄素具有促进骨形成、抑制破骨细胞骨吸收作用, 有效预防骨量丢失。随机双盲对照的临床研究也显示金雀异黄素具有 HRT 同等的疗效^[5], 但是其对骨代谢作用的机制仍不十分清楚。破骨细胞分泌组织蛋白酶 K (cathepsin K, CK) 直接参与溶骨过程, 在骨吸收过程中具有十分重要的作用, 因此, 我们从骨巨细胞瘤组织中分离纯化出人破骨样细胞 (osteoclast-like cells, OCLs), 并采用不同浓度金雀异黄素干预, 了解 IL-1 α 刺激破骨样细胞后, 组织蛋白酶 K 的表达情况, 从而探讨金雀异黄素在骨代谢中的作用。

1 材料与方法

1.1 仪器

Nikon300 型自动摄像倒置显微镜(Nikon 公司); 紫外/可见分光光度计、Gene Amp2400PCR 扩增仪(Perkin Elmer 公司); 细胞培养瓶及培养板(Nunc 公司)。

1.2 试剂

无酚红 α -MEM 培养基、I 型胶原酶、IL-1 α 、金雀异黄素、ICI 182.780 均购自 Sigma 公司; 胰蛋白酶-EDTA、焦碳酸二乙酯(DEPC)、Trizol、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司; 逆转录试剂盒购自 Promega 公司; Taq 酶购自上海生工生物工程有限公司; 引物合成于上海博亚生物工程有限公司; GeneRulerTM 100DNA Ladder 购自上海生工生物工程有限公司。萘酚 AS-BI 磷酸钠购自 Sigma 公司; 羊抗人组织蛋白酶 K 一抗、羊抗人 β 肌动蛋白一抗、驴抗羊 IgG-HRP 二抗、化学发光增强试剂盒(ECL)均购自 Santa Cruz 公司; 蛋白质标准(marker) 购自 Biolabs 公司。

1.3 破骨样细胞的来源

病理组织来源于一位 46 岁的骨肿瘤患者, 经过活检, 确诊为骨巨细胞瘤。破骨样细胞的纯化参见文献[6]的方法。

收稿日期: 2005-11-18 接受日期: 2006-02-27

湖北省自然科学基金资助项目(No.2004ABA251)

* 通讯作者。Tel: 027-83662044, Fax: 027-83662640, E-mail:

wyl_wuhan@yahoo.com.cn

1.4 抗酒石酸酸性磷酸酶染色(TRAP 染色)

TRAP 染色是鉴定破骨细胞的特征性染色方法, 具体方法参考文献[7]。

1.5 干预实验

破骨样细胞接种于 25 cm² 培养瓶, 用含 10% FBS 的无酚红 MEM 培养液培养, 汇片后换含 0.1% 牛血清白蛋白(BSA)的无血清 MEM 培养液培养 24 h, 分成 6 组: (1)阴性对照组, (2)阳性对照组(未经金雀异黄素预处理, 但以后加入 IL-1 α 作用 1 h), (3)金雀异黄素(10⁻¹⁰ mol/L), (4)金雀异黄素(10⁻⁸ mol/L), (5)金雀异黄素(10⁻⁶ mol/L), (6)金雀异黄素(10⁻⁸ mol/L)+ICI 182.780 (10⁻⁸ mol/L)。不同浓度金雀异黄素温育 48 h 后, 加入 1.2 nmol/L IL-1 α 作用 1 h (阴性对照组除外), Trizol 收集细胞。

1.6 RT-PCR

加入 Trizol 并吹打裂解细胞, 抽提总 RNA, 取 2 μ g 总 RNA 合成 cDNA, 取 1 μ l cDNA 进行 RT-PCR 扩增组织蛋白酶 K、 β 肌动蛋白基因, 反应总体积 20 μ l, 引物序列及反应条件见表 1。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, 实验重复 3 次, 溴化乙啶染色显影并照相。

1.7 Western 印迹

取 35 μ g 细胞总蛋白溶液与 4 \times SDS 加样缓冲液混匀, 100 $^{\circ}$ C 加热使蛋白质变性 3 min, 点样于 7.5% SDS-PAGE 胶中, 100 V 电泳, 50 mA、4 $^{\circ}$ C 冰箱将蛋白质电转移至硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜用含 5% 脱脂牛奶室温下封闭 3 h。PBS(含 0.01% Tween20)洗膜 15 min 1 次, 5 min 2 次。分别用羊抗人组织蛋白酶 K 一抗(1:1 000 稀释)杂膜 4 h, PBS(含 0.01% Tween20)洗膜, 5 min 2 次, 驴抗羊 IgG-HRP 二抗(1:3 000)杂膜 1 h, PBS(含 0.01% Tween20)洗膜 15 min 1 次, 5 min 4 次, ECL 发光自显影, 实验重复 3 次; 羊抗人 β 肌动蛋白一抗(1:1 000 稀释)杂膜 4 h, PBS(含 0.01% Tween20)洗膜, 5 min 2 次, 驴抗羊 IgG-HRP 二抗(1:3 000)杂膜 1 h, PBS(含 0.01% Tween20)洗膜 15 min 1 次, 5 min 4 次, ECL 发光自显影, 实验重复 3 次;

洗片显影, 用 Imagemaster VDS 成像分析系统进行光密度检测。

1.8 统计学处理

数据用($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用 *t* 检验, 用 spss11.5 软件分析。

2 结果

2.1 TRAP 染色

破骨细胞经 TRAP 染色后, 显示大量空泡和伪足, 胞浆成棕黄色, 胞核成棕褐色(图 1)。在低倍镜下任选 10 个视野, 计算破骨样细胞纯度, 纯度为 97.2 \pm 0.513%。

2.2 mRNA 表达

与阴性对照组相比, 阳性对照组经 IL-1 α 刺激后, 组织蛋白酶 K mRNA 表达量明显增加($P<0.01$)。与阳性对照组相比, 金雀异黄素抑制 IL-1 α 刺激后组织蛋白酶 K mRNA 表达, 且呈剂量依赖关系($P<0.01$)。与金雀异黄素(10⁻¹⁰ mol/L)组相比, 金雀异黄素+ICI 182.780 组组织蛋白酶 K mRNA 表达量增加($P<0.01$) (图 2A, 图 2B, 图 2C)。

2.3 蛋白质表达

与阴性对照组相比, 阳性对照组经 IL-1 α 刺激后, 组织蛋白酶 K 蛋白质表达量明显增加($P<0.01$)。与阳性对照组相比, 金雀异黄素抑制 IL-1 α 刺激后



图 1 TRAP 染色

破骨细胞经 TRAP 染色后, 显示大量空泡和伪足, 胞浆成棕黄色, 胞核成棕褐色 (400 \times)

表 1 组织蛋白酶 K、 β 肌动蛋白基因引物序列及 RT-PCR 反应条件

扩增基因	引物序列(5' \rightarrow 3')	退火温度($^{\circ}$ C)	Mg ²⁺ 浓度(mmol/L)	循环次数(次)	产物(bp)
组织蛋白酶 K	有义: CTCAAGGTTCTGCTGCTA	53	1.3	30	381
	反义: GACAGGAGTAACATATCC				
β 肌动蛋白	有义: CCTCGCCTTTGCCGATCC	56	1.7	30	620
	反义: GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC				

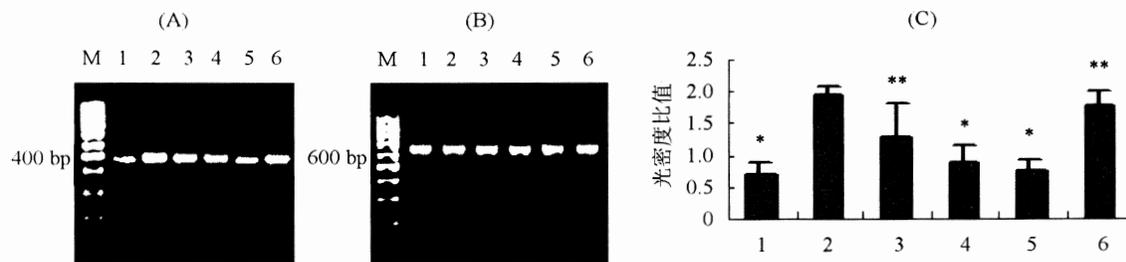


图2 组织蛋白酶K、 β 肌动蛋白 mRNA 表达

(A)组织蛋白酶K mRNA 表达; (B) β 肌动蛋白 mRNA 表达; (C)组织蛋白酶K/ β 肌动蛋白 mRNA 光密度比值。1: 阴性对照组; 2: 阳性对照组; 3: 金雀异黄素(10^{-10} mol/L); 4: 金雀异黄素(10^{-8} mol/L); 5: 金雀异黄素(10^{-6} mol/L); 6: 金雀异黄素(10^{-8} mol/L)+ICI 182.780 (10^{-8} mol/L)。与阳性对照组相比, * $P < 0.01$; 与阳性对照组相比, ** $P < 0.05$ 。

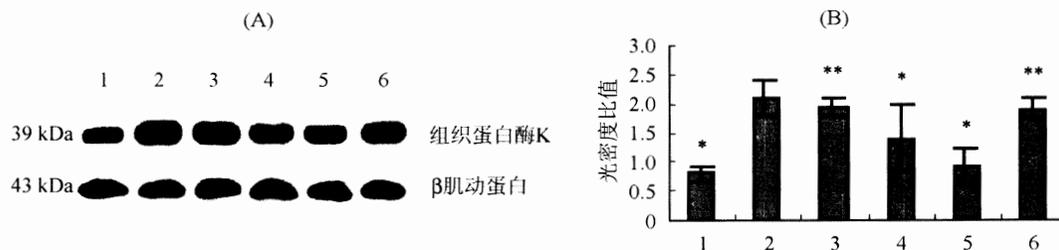


图3 组织蛋白酶K表达(Western 印迹)

(A)组织蛋白酶K、 β 肌动蛋白表达; (B)组织蛋白酶K/ β 肌动蛋白光密度比值。1: 阴性对照组; 2: 阳性对照组; 3: 金雀异黄素(10^{-10} mol/L); 4: 金雀异黄素(10^{-8} mol/L); 5: 金雀异黄素(10^{-6} mol/L); 6: 金雀异黄素(10^{-8} mol/L)+ICI 182.780(10^{-8} mol/L)。与阳性对照组相比, * $P < 0.01$; 与阳性对照组相比, ** $P < 0.05$ 。

组织蛋白酶K表达,且呈剂量依赖关系($P < 0.01$)。与金雀异黄素(10^{-8} mol/L)组相比,金雀异黄素+ICI 182.780组组织蛋白酶K表达量增加($P < 0.01$)。(图3A,图3B)。

3 讨论

绝经后骨质疏松是危害妇女健康的主要因素,因此,女性需要适当运动、养成良好的生活习惯,在年轻时达到较高的峰值骨量;更为重要的是防止绝经后骨量快速丢失。然而,绝经后,长期雌激素替代治疗所带来的安全性以及顺应性问题使得雌激素在临床上长期使用受到限制^[8],因此需要寻找其他有效而安全的替代产品,临床对比实验证实:植物雌激素可有效预防妇女绝经后骨量的快速丢失^[9],植物雌激素有多种类型,其中以金雀异黄素生物活性最强。研究表明金雀异黄素可以促进成骨细胞分化^[10]、抑制破骨细胞生成^[11],但是其在骨代谢作用的分子机制有待于阐明。

在炎症反应以及雌激素缺乏时,组织细胞分泌IL-1 α 增加,IL-1 α 增强破骨细胞的溶骨活性^[12],而组织蛋白酶K和碳酸酐酶II是破骨细胞分泌并参与

溶骨过程的关键酶。本实验发现IL-1 α 在转录水平上促进破骨样细胞表达组织蛋白酶K,而17 β -雌二醇可以抑制组织蛋白酶K表达,说明雌激素核受体参与上述转录过程;在雌激素受体拮抗剂ICI 182.780存在时,金雀异黄素所表现出抑制IL-1 α 的作用受到部分拮抗,这一点,说明雌激素受体参与组织蛋白酶K表达,也进一步验证了破骨细胞是雌激素作用的靶细胞^[13]。金雀异黄素抑制IL-1 α 刺激后组织蛋白酶K表达,且呈剂量依赖关系,雌激素受体拮抗剂阻断了金雀异黄素的部分作用,显示出金雀异黄素的雌激素样效应;在雌激素受体拮抗剂ICI 182.780存在时,金雀异黄素作用受到部分拮抗,但组织蛋白酶K表达量仍低于阳性对照组,两组相比有显著性差异($P < 0.05$),说明金雀异黄素的抑制作用不仅仅是通过雌激素受体产生,也可能与金雀异黄素所具备抑制蛋白酪氨酸激酶作用有关,有待于进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] Kudo O *et al.* *J Pathol*, 2002, **198**: 220
- [2] Khosla S. *Endocrinology*, 2001, **142**: 5050

- [3] Uemura H *et al. Horm Metab Res*, 2005, **37**: 226
- [4] Brzezinski A *et al. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1999, **85**: 47
- [5] Morabito N *et al. J Bone Miner Res*, 2002, **17**: 1904
- [6] 王运林等. *中华内分泌代谢杂志*, 2004, **20**: 556
- [7] van de Wijngaert FP *et al. J Histochem Cytochem*, 1986, **34**: 1317
- [8] Rossouw JE *et al. JAMA*, 2002, **288**: 321
- [9] Kreijkamp-Kaspers S *et al. JAMA*, 2004, **292**: 65
- [10] Sugimoto E *et al. Int J Mol Med*, 2000, **5**: 515
- [11] Gao YH *et al. Biochem Pharmacol*, 1999, **58**: 767
- [12] Sunyer T *et al. J Clin Invest*, 1999, **103**: 1409
- [13] Mano H *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **223**: 637

Genistein Inhibit Cathepsin K Expression Stimulated by IL-1 α in Osteoclast-like Cells

Yun-Lin Wang*, Xiao-Qing Liu, Fei Yang, Han-Hua Yao, Hong-Bing Wang, Qin Xia, Huan-Li Zhu
(Department of Gerontism, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract The osteoclast-like cells (OCLs) isolated from tissue of human giant cell tumor of bone, were stimulated by IL-1 α in the presence of genistein. Then the expression of cathepsin K (CK) was determined by RT-PCR and Western blot in OCLs. Compared with control group, the expressions of CK were up-regulated after stimulated by IL-1 α in other groups ($P < 0.01$). Genistein down-regulated CK gene expression stimulated by IL-1 α at the transcription level stimulated in dose-dependent manner ($P < 0.01$) and its effect was abrogated partly after treated with the estrogen receptor antagonist ICI 182.780. Genistein inhibit CK expression stimulated by IL-1 α through estrogen receptor in OCLs. We found IL-1 α stimulated the expression of CK in OCLs.

Key words genistein; osteoclast-like cells; cathepsin K; IL-1 α

Received: November 18, 2005 Accepted: February 27, 2006

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hubei Province (No.2004ABA251)

*Corresponding author. Tel: 86-27-83662044, Fax: 86-27-83662640, E-mail: wyl_wuhan@yahoo.com.cn