

## 葡萄糖对 MG63 细胞株护骨素、护骨素配体及其相关因子表达的影响

## Effects of glucose on expression of osteoprotegerin, ligand of osteoprotegerin and related cytokines in MG63 cells

王加林, 周 玮, 赵亚平, 张 勇, 惠亮亮 (解放军第 82 医院内分泌科, 淮安 223001)

**[摘要]** **目的:** 观察不同葡萄糖浓度对人成骨肉瘤 MG63 细胞株护骨素(OPG)、护骨素配体(OPGL)及肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )表达的影响。**方法:** MG63 细胞经不同浓度(5.5、16.7、33.3 mmol/L)葡萄糖处理后,用 RT-PCR 法检测上述基因表达情况。**结果:** 高糖能下调 MG63 细胞中 OPG 及 TGF- $\beta$  的表达( $P < 0.05$ ),上调 OPGL、M-CSF 和 TRAIL 的表达( $P < 0.05$ )。**结论:** 高糖环境可能导致成骨细胞中 OPG 及 TGF- $\beta$  的表达减少, OPGL、M-CSF 和 TRAIL 等细胞因子的表达增多,使破骨细胞的数目和活性增加,骨吸收增强和骨量丢失,这可能是糖尿病骨质疏松症的一个重要的发病机制。

**[关键词]** 糖尿病;骨质疏松;葡萄糖;MG63 细胞;护骨素

**[中图分类号]** R 587.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)07-0798-03

近年来发现,肿瘤坏死因子(TNF)家族的新成员——护骨素(osteoprotegerin, OPG)、护骨素配体(osteoprotegerin ligand, OPGL)及其相关因子,如肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)、转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )等,在调节破骨细胞的形成和活化方面起重要作用<sup>[1-5]</sup>。这些细胞因子之间形成了复杂的调控网络,是许多骨代谢调节激素(因子)在骨细胞水平发挥调节作用的共同通道。糖尿病易并发骨质疏松症已被公认,糖尿病对骨代谢的影响主要表现为骨吸收增加,骨形成减少与缓慢,使骨矿物质含量减少和骨质疏松<sup>[6]</sup>。其发病机制较为复杂,确切的细胞机制尚未阐明。

本实验拟观察不同浓度葡萄糖环境下人成骨细胞表型特征的 MG63 细胞株中 OPG、OPGL 及其 TRAIL、M-CSF、TGF $\beta$  的表达情况,进一步探讨糖尿病骨质疏松症的发病机制。

## 1 材料和方法

**1.1 细胞培养** 第 106 代 MG63 细胞株(中南大学湘雅二医院代谢内分泌研究所惠赠),以  $5 \times 10^5$ /ml 密度接种于  $50 \text{ cm}^2$  培养瓶(Nunc 公司),用含 10% 胎牛血清、50 mg/L 维生素 C 的无酚红 MEM 培养液(Sigma 公司),于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养,2 d 换液 1 次。

**1.2 干预试验** MG63 细胞达 60%~70% 融合后,

换含 0.1% 牛血清白蛋白的无血清 MEM 培养液培养 3 h,再分别用含不同浓度葡萄糖的 MEM 培养液干预,分为 4 组:(1)培养基对照组;(2)5.5 mmol/L 葡萄糖组;(3)16.7 mmol/L 葡萄糖组;(4)33.3 mmol/L 葡萄糖组。干预 24 h 后,抽提细胞总 RNA 行 RT-PCR 操作。

**1.3 半定量 RT-PCR** TRIzol(Gibco 公司)抽提细胞总 RNA。取 2  $\mu\text{g}$  总 RNA,用逆转录试剂盒(Promega 公司)合成 cDNA,再取 1  $\mu\text{l}$  cDNA 行 PCR 扩增 OPG、OPGL、M-CSF、TRAIL、TGF $\beta$  基因,以  $\beta$ -actin 基因为内对照,OPG 基因的正向引物为 5'-AGT GGG AGC AGA AGA CAT TG-3',反向引物为 5'-ATT GGA CCT GGT TAC CTA TC-3',退火温度为  $55^\circ\text{C}$ , $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 20 mmol/L,30 个循环,产物 268 bp。OPGL 基因的正向引物为 5'-GCG TCG CCC TGT TCT TCT AT-3',反向引物为 5'-TTG GTG CTT CCT CCT TTC AT-3',退火温度为  $55^\circ\text{C}$ , $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 20 mmol/L,30 个循环,产物 598 bp。M-CSF 基因的正向引物为 5'-CTG GCG AGC AGG AGT ATC AC-3',反向引物为 5'-TCA GAG TCC TCC CAG GTC AA-3',退火温度为  $55^\circ\text{C}$ , $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 20 mmol/L,30 个循环,产物 606 bp。TRAIL 基因的正向引物为 5'-GGC ATT CAT TCC TGA GCA ACT T-3',反向引物为 5'-GAT CTC GTG ATC TAC CCA CCT T-3',退火温度为  $57^\circ\text{C}$ , $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 20 mmol/L,30 个循环,产物 908

**[作者简介]** 王加林,硕士,主任医师。

E-mail: WJLDR@yahoo.com.cn

bp。TGF $\beta$  基因的正向引物为 5'-GAG TTG TGC GGC AGT GGT TGA G-3', 反向引物为 5'-CGA GGC AGA AGT TGG CAT GGT AG-3', 退火温度为 56 $^{\circ}$ C, Mg $^{2+}$  浓度为 20 mmol/L, 循环 30 次, 产物 366 bp。 $\beta$ -actin 基因的正向引物为 5'-CGT GGG CCG CCC TAG GCA CCA-3', 反向引物为 5'-TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG G-3', 退火温度为 55 $^{\circ}$ C, Mg $^{2+}$  浓度为 20 mmol/L, 循环 30 次, 产物 243 bp。10  $\mu$ l PCR 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色, 拍照, 并用 Imagemaster VDS 凝胶图像分析系统行条带光密度检测, 测值与  $\beta$ -actin 光密度值比较, 比值表示各 mRNA 的表达量。

1.4 统计学处理 用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析。定量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数比较用单因素方差分析, 两两之间比较用 SNK- $q$  检验。

## 2 结果

RT-PCR 半定量结果显示, 与对照组和 5.5

mmol/L 葡萄糖组相比, 16.7 mmol/L 的葡萄糖可降低 OPG mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ), 在 33.3 mmol/L 时这种下调作用更明显。高浓度葡萄糖能上调 MG63 细胞中 OPGL mRNA 的表达, 16.7 mmol/L 时同体积 RT-PCR 产物电泳结果的光密度值即较对照组和 5.5 mmol/L 组显著增加 ( $P < 0.05$ ), 33.3 mmol/L 时增加更明显。

葡萄糖可上调 MG63 细胞中 M-CSF mRNA 的表达: 5.5 mmol/L 葡萄糖即可出现上调作用 ( $P < 0.05$ ), 16.7 mmol/L 葡萄糖作用更明显, 并在 33.3 mmol/L 时达到最大效应。葡萄糖能上调 MG63 细胞中 TRAIL mRNA 的表达: 16.7 mmol/L 的葡萄糖即可出现上调作用 ( $P < 0.05$ ), 33.3 mmol/L 浓度时这种上调作用更明显。葡萄糖能下调 MG63 细胞中 TGF $\beta$  mRNA 的表达: 16.7 mmol/L 的葡萄糖即可显著降低 TGF- $\beta$  mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ), 33.3 mmol/L 浓度时这种下调作用更明显。

表 1 不同浓度葡萄糖对 MG63 细胞 OPG、OPGL 及其相关因子 mRNA 表达的影响

( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别	OPG	OPGL	TRAIL	M-CSF	TGF- $\beta$
对照组	0.961 4 $\pm$ 0.027 7	0.109 2 $\pm$ 0.004 3	0.739 8 $\pm$ 0.023 0	0.998 7 $\pm$ 0.012 1	1.113 7 $\pm$ 0.028 0
葡萄糖组 ( $c_B$ /mmol $\cdot$ L $^{-1}$ )					
5.5	0.960 3 $\pm$ 0.012 7	0.135 0 $\pm$ 0.009 5*	0.780 6 $\pm$ 0.023 3	1.071 1 $\pm$ 0.026 3*	1.066 9 $\pm$ 0.047 0
16.7	0.919 3 $\pm$ 0.019 0* $\Delta$	0.201 4 $\pm$ 0.022 0* $\Delta$	0.883 9 $\pm$ 0.034 6* $\Delta$	1.452 3 $\pm$ 0.036 7* $\Delta$	0.984 4 $\pm$ 0.054 6* $\Delta$
33.3	0.907 0 $\pm$ 0.014 4* $\Delta$	0.233 8 $\pm$ 0.019 8* $\Delta$ $\blacktriangle$	1.003 8 $\pm$ 0.070 4* $\Delta$ $\blacktriangle$	1.807 7 $\pm$ 0.042 2* $\Delta$ $\blacktriangle$	0.966 6 $\pm$ 0.040 7* $\Delta$

\*  $P < 0.05$  与对照组比较;  $\Delta P < 0.05$  与 5.5 mmol/L 葡萄糖组比较;  $\blacktriangle P < 0.05$  与 16.7 mmol/L 葡萄糖组比较

## 3 讨论

骨质疏松与遗传有关, 是破骨细胞 (OC) 和成骨细胞 (OB) 之间活性不平衡的结果。动物实验表明, 并发骨质疏松症的糖尿病大鼠在病程早期即出现成骨细胞数下降、破骨细胞数上升, 骨形成减少, 骨吸收相对大于骨形成<sup>[7]</sup>。糖尿病并发骨质疏松症的病理机制较为复杂, 其发病与胰岛素或胰岛素样生长因子-1 缺乏、持续高糖状态、高级糖基化终末产物增多及糖尿病并发症等有关, 但其确切的细胞机制尚未阐明。

近年发现 OPG 是一种新的 TNF 受体家族的分泌型蛋白, 是核因子  $\kappa$ B 受体活化因子 (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand, RANKL)、OPGL、TRAIL 等 TNF 家族成员的假受体, 是骨代谢的一个重要的负调控因子, 能抑制 OC 生成、活

化, 减少骨吸收<sup>[3-5]</sup>。OPG 主要通过中和性结合 OPGL 发挥骨保护作用, 后者是诱导 OC 生成的关键性细胞因子, 通过作用于 OC 上的受体 RANK 刺激 OC 形成、分化及活化, 增强骨吸收。OPGL 能刺激骨髓、脾脏甚至外周血中破骨细胞前体细胞分化、成熟, 但此作用需有适当浓度的 M-CSF 参与<sup>[4,8]</sup>。OPG 竞争性结合 OPGL, 能阻断 OPGL 与其靶信号受体 RANK 的结合, 抑制 OPGL/RANK 对破骨细胞信号转导的活化, 减少 OC 生成, 发挥抗骨质疏松作用。OPG 在转基因小鼠中过度表达可以导致骨质疏松, 提示这种 OPG 转基因小鼠存在破骨细胞分化缺陷<sup>[9]</sup>。相反, OPG 基因敲除小鼠由于破骨细胞分化和活性明显增强, 所以表现为严重的骨质疏松<sup>[10]</sup>。TNF 配体家族另一成员 TRAIL 是一种能与多种受体结合、发挥诱导或抗凋亡作用的细胞因子, 它可结合 OPG, 并相互中和对方的功能<sup>[3]</sup>, 从而

间接解除 OPG 对 OPGL 的抑制。这表明 OC 生成、分化过程处于一个复杂的细胞因子调节网络中。

本研究从 mRNA 水平观察了不同浓度葡萄糖对 MG63 细胞株中 OPG/OPGL 及其相关因子表达的影响。发现高糖能使 OPGL mRNA 表达增加,且呈剂量依赖性,同时,高糖能抑制 MG63 细胞中 OPG mRNA 的表达,使细胞内 OPG/OPGL 比率降低。提示高糖可能通过调节 OPG/OPGL 的水平对成骨细胞产生影响,如果此现象在正常成骨细胞及整体中存在,此可能是在成骨细胞环节糖尿病导致骨质疏松症的机制之一。

葡萄糖对 MG63 细胞中与 OPG/OPGL 有关的基因,如 TRAIL、M-CSF 和 TGF $\beta$  的表达亦有调节作用。高糖能增加 MG63 细胞中 TRAIL mRNA 和 M-CSF mRNA 的表达。其中,M-CSF 是 OC 生成的必要条件,它与 OPGL 协同作用才能使 OC 祖细胞分化、成熟<sup>[4,8]</sup>。刘好等<sup>[11]</sup>研究发现,长期高糖可诱导胰岛细胞发生凋亡,使胰岛细胞数量进行性减少。高糖对 TRAIL 的调节提示,高糖还可能从细胞凋亡的途径以自分泌或旁分泌的形式调节 OB 或 OC 的数量,这有待进一步研究。TGF- $\beta$  是具有多种功能的细胞因子,能提高转化为 OC 的前体细胞的比例,是 OC 形成的因子之一。此外,TGF- $\beta$  也能上调 OPG 而下调 OPGL 的表达<sup>[12-14]</sup>,我们的实验表明,高糖能下调成骨细胞中 TGF- $\beta$  的表达。由此推测,高糖对 OPG/OPGL 表达的调节作用,可能部分是通过 TGF- $\beta$  介导的。

## [参考文献]

- [1] Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, et al. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women [J]. J Clin Invest, 2003, 111: 1221-1230.
- [2] Alexander E H, Rivera F A, Marriott I, et al. Staphylococcus aureus-induced tumor necrosis factor-related apoptosis-induc-

ing ligand expression mediates apoptosis and caspase-8 activation in infected osteoblasts[J]. BMC Microbiol, 2003, 3:5.

- [3] Pritzker L B, Scatena M, Giachelli C M. The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival[J]. Mol Biol Cell, 2004, 15: 2834-2841.
- [4] Bell N M. RANK ligand and the regulation of skeletal remodeling[J]. J Clin Invest, 2003, 111: 1120-1122.
- [5] Hofbauer L C, Khosla S, Dunst C R, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption[J]. J Bone Miner Res, 2000, 15: 2-12.
- [6] 廖二元, 超楚生, 伍汉文. 内分泌学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1818-1819.
- [7] Ogata N, Chikazu D, Kubota D, et al. Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover[J]. J Clin Invest, 2000, 105: 935-943.
- [8] Felix R, Cecchini M G, Fleisch H. Macrophage colony stimulating factor restores *in vivo* bone resorption in the op/oposteopetrotic mouse[J]. Endocrinology, 1990, 127: 2592-2594.
- [9] Fazzalari N L, Kuliwaba J S, Atkins G J, et al. The ratio of messenger RNA levels of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand to osteoprotegerin correlates with bone remodeling indices in normal human cancellous bone but not in osteoarthritis[J]. J Bone Miner Res, 2001, 16: 1015-1027.
- [10] Theill L E, Boyle W J, Penninger J M. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution[J]. Annu Rev Immunol, 2002, 20: 795-823.
- [11] 刘好, 曹仁贤, 文格波, 等. 高糖诱导胰岛细胞凋亡机制的研究[J]. 医学研究生学报, 2005, 18: 882-885.
- [12] Murakami T, Yamamoto M, Ono K, et al. Transforming growth factor-beta1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 252: 747-752.
- [13] Thirunavukkarasu K T, Miles R R, Halladay D L, et al. Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 36241-36250.
- [14] Weitzmann M N, Cenci S, Haug J, et al. B lymphocytes inhibit human osteoclastogenesis by secretion of TGF $\beta$ [J]. J Cell Biochem, 2000, 78: 318-324.

[收稿日期] 2007-05-20

[修回日期] 2007-06-12

[本文编辑] 尹 茶