

[文章编号] 1000-4718(2007)03-0584-03

雌激素对人骨髓间质细胞 BMP-2 mRNA 表达的影响*

王晶, 张涓

(暨南大学医学院血液研究所, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 探讨雌激素对人骨髓间质干细胞 BMP-2 基因转录的影响。方法: 将骨髓间质干细胞第 3 代细胞经 1 周成骨诱导后, 分为 17 β -雌二醇 100 nmol/L 处理组和对照组, 通过 RT-PCR 法扩增 BMP-2 mRNA, 测定扩增条带的吸光度值, 并与 3-磷酸甘油醛脱氢酶看家基因 GAPDH 的 mRNA 之比值表示产物 mRNA 的相对含量。结果: 雌激素处理组 BMP-2 mRNA 表达明显高于非处理组 ($P < 0.05$)。结论: 雌激素通过刺激间质细胞 BMP-2 mRNA 的表达以发挥其促成骨作用。

[关键词] 骨髓间质干细胞; 骨形态发生蛋白质类; 雌激素类

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effects of estrogen on bone morphogenetic protein-2 gene transcription in human bone mesenchymal stem cells

WANG Jing, ZHANG Yuan

(Institute of Hematology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China. E-mail: tzyuan@jnu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effects of estrogen on bone morphogenetic protein-2 gene transcription in human bone mesenchymal stem cells. **METHODS:** Primary cultures of MSCs were established from normal adult volunteer iliac crest bone marrow aspirates. The third passage of MSCs was supplemented with 50 mg/L ascorbic acid, 10 mmol/L β -glycerophosphate, and 10 nmol/L dexamethasone, to induce MSCs osteogenic differentiation. At day 8, the cultures were treated with 100 nmol/L 17 β -estradiol. The expression of bone morphogenetic protein-2 mRNA was detected by reverse transcription (RT-PCR), the ratio of the electrophoretic results of the BMP-2 mRNA with the housekeeping gene of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA were used to show the relative content of the mRNA. **RESULTS:** Bone marrow mesenchymal stem cells obtained from human expressed BMP-2 mRNA as shown by RT-PCR. After 24 h of 100 nmol/L E2 treatment, MSCs BMP-2 mRNA levels increased significantly. **CONCLUSION:** Estrogen may enhance bone formation by increasing the transcription of BMP-2 gene of MSCs.

[KEY WORDS] Bone marrow mesenchymal stem cells; Bone morphogenetic proteins; Estrogens

骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs) 是一类对细胞增殖和分化具有重要调节作用的酸性多肽物质, 它们属于 TGF- β 超家族。BMP-2 作为 BMPs 家族的成员之一, 对机体功能具有广泛的调节作用。在胚胎时期, BMP-2 已有广泛表达, 它通过影响细胞的增殖、分化和凋亡等过程对许多器官的发育起到调节作用^[1]。不仅如此, BMPs 还是机体最重要的成骨诱导因子, 在已发现的 15 种 BMPs 分子中, 以 BMP-2 的成骨诱导能力最强。它在骨骼的修复和重建过程发挥着关键作用^[2]。

与 BMPs 的生长因子作用不同的是, 雌激素是作为内分泌激素通过血液循环对机体多器官、系统的功能发挥其调节作用, 而骨骼正是其重要的靶器官

之一。绝经后妇女因雌激素水平下降会引发骨质疏松症, 雌激素替代疗法是治疗绝经后骨质疏松症的最有效的方法之一。既往的大量研究显示, 雌激素是通过其抑制破骨细胞的骨吸收而发挥治疗作用的。而近年来的研究发现, 给予患者雌激素治疗后可刺激其成骨细胞的功能^[3]。而动物实验也发现, 雌激素治疗后可使骨形成增加^[4,5]。尽管雌激素促进骨形成的机制并不十分清楚。然而有学者发现, 雌激素可以上调成骨细胞系 MN7 细胞 BMP-2 mRNA 的表达^[6], 这为进一步揭示雌激素促成骨机制提供了研究线索。骨髓间质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 由于具有多向分化潜能而成为近年来研究的热点^[7]。它在一定条件下可向成骨细胞

[收稿日期] 2006-06-30 [修回日期] 2006-09-28

* [基金项目] 国务院侨办重点学科建设基金资助项目 (2005)

Tel: 020-85226787; E-mail: tzyuan@jnu.edu.cn

分化。而有研究发现 BMSCs 细胞内有雌激素受体 ER α 及 ER β 的表达^[8]。这一研究结果说明雌激素对间质干细胞的功能可能具有调节作用。雌激素是否也会对 MSCs 细胞的 BMP-2 mRNA 表达产生影响呢? 本课题将以此为研究内容, 试图阐明雌激素促进成骨的作用机制。

材 料 和 方 法

1 主要试剂和仪器

DMEM-LG 培养基 (Gibco), 特级胎牛血清 (天津 TBD 公司), 地塞米松、 β -甘油磷酸钠、抗坏血酸及雌激素 E2 (Sigma), Trizol 试剂及反转录酶试剂盒 Superscript III (Gibco), TaqDNA 聚合酶 (Promega), PCR 扩增仪 (BioMetra)。

2 方法

2.1 引物设计与合成 引物序列参考文献^[9, 10], 由上海英骏生物技术有限公司合成。其中 BMP-2 (forward) 5' - CAGAGACCCACCCCAAGCA - 3', BMP-2 (reverse) 5' - CTGTTTGTGTTTGGCTTGAC - 3', 扩增目的基因片段长度 688 bp; GAPDH (forward) 5' - GGGCTGCTTTTAACTCTGCT - 3', GAPDH (reverse) 5' - TGGCAGTTTTTCTAGACGG - 3', 扩增目的基因片段长度 702 bp。

2.2 细胞培养 从 6 名 21-38 岁健康志愿者髂前上棘处抽取肝素化骨髓约 3 mL, 采用改良的全骨髓分离培养法^[11]。细胞生长至瓶底约 90% 面积时, 按 1:3 进行传代培养。

取第 3 代细胞用于实验。将 6 份细胞标本每份分为两组, 以 1×10^5 /well 接种于 2 个 6 孔培养板中, 将每个细胞标本中的两份细胞随机分到 A、B 两组, 其中 A 组为雌激素处理组, B 组为非雌激素处理组。常规培养 3 d 后, 用含 10^{-8} mol/L 地塞米松、10 mmol/L β -磷酸甘油和 50 mg/L 抗坏血酸的成骨培养基培养诱导 7 d。然后在培养基中加入 100 nmol/L 的 17 β -雌二醇作用 24 h 后提取 RNA。

2.3 RNA 提取和 cDNA 合成 应用 Trizol 试剂盒按常规方法提取 RNA。并应用随机引物和反转录酶 Superscript III 试剂盒反转录合成 cDNA 第一链, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存。合成的 cDNA 经 RT-PCR 检测 β 2 微球蛋白基因进行质量控制。

2.4 反转录-多聚酶链反应 (RT-PCR) PCR 总反应体系为 25 μ L, 其中模板量为 2 μ L, 引物浓度为 0.5 μ mol/L、0.1 mmol/L dNTP、1.25 U Taq 聚合酶和 1 \times PCR 缓冲液。PCR 共进行 40 循环, 其中 BMP-2 每一循环包括: 94 $^{\circ}$ C 1 min (首次 3 min), 58 $^{\circ}$ C 1 min 和 68 $^{\circ}$ C 1 min (末次 6 min); 而 GAPDH 每一

循环包括: 94 $^{\circ}$ C 1 min (首次 3 min), 51 $^{\circ}$ C 1 min 和 72 $^{\circ}$ C 1 min (末次 6 min)。

2.5 凝胶电泳 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶 (溴乙锭染色) 中电泳分析结果。凝胶成像分析系统对 PCR 扩增条带进行图像扫描, 测吸光度值, 用 BMP-2 与 GAPDH 的比值表示 BMP-2 mRNA 的相对含量。

3 统计学处理

利用 SPSS 9.0 统计软件包在微机上行统计学处理。结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用成组设计 t 检验。

结 果

1 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

结果见图 1。

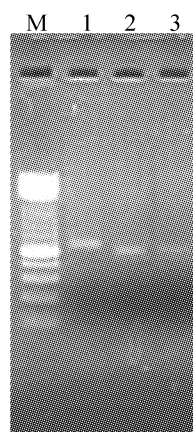


Fig 1 Electrophoretic result of the BMP-2 mRNA through RT-PCR. M: marker; Lane 1: GAPDH; Lane 2: E2 treatment; Lane 3: control.

图 1 RT-PCR 检测人 MSCs 细胞 BMP-2 mRNA 表达的电泳结果

2 雌激素对人骨髓间充质细胞 BMP-2 mRNA 表达的影响

6 份细胞标本中的两组细胞均有扩增条带出现, 其产物片段的大小与待扩增的目的基因片段长度相一致。其中 A 组 BMP-2 mRNA 相对值为 0.46 ± 0.10 , 而 B 组 BMP-2 mRNA 相对值为 0.18 ± 0.07 , 成组设计的 t 检验示 $P < 0.01$, 即雌激素处理 24 h 后 MSCs 细胞 BMP-2 mRNA 表达升高。

讨 论

绝经后妇女因体内雌激素水平下降会引发骨质疏松症, 雌激素替代治疗可减少患者的骨量丢失和骨质疏松所导致的骨折发生。既往的研究普遍认为雌激素对骨骼的保护机制主要是由于抑制破骨细胞的骨吸收作用。然而, 近些年来有临床研究和动物实验显示, 雌激素可刺激成骨细胞的功能和促进骨

形成^[3,4],而雌激素促进骨形成的确切机制尚未完全阐明。

BMPs 是一类与成骨分化密切相关的生长因子,它对胎儿时期骨骼发生和形成以及出生后骨的重建和修复均有重要调节作用。BMP-2 作为 BMPs 家族的重要成员,与成骨分化的关系尤为密切。而 MSCs 具有多向分化潜能,且其成骨分化能力尤为强大。有 BMPs 的存在时可诱导间充质干细胞向骨前体细胞分化,并通过软骨化骨的方式形成新生的骨组织。在这一过程中,BMPs 主要起 3 个作用:趋化靶细胞,加速细胞有丝分裂和促进细胞分化^[12]。正由于 BMPs 的强大成骨活性以及间质干细胞的易成骨分化特性,使得许多学者将 BMP-2 和间充质干细胞联合使用以治疗动物的骨缺损模型^[13-15]。从上可以看出,间质干细胞具有强大成骨分化潜能,而 BMP-2 又是强大的促成骨细胞因子,两者相互作用在机体的成骨过程中发挥重要作用。雌激素的促成骨作用是否与两者有关呢?由于有研究证实间质干细胞内有雌激素受体 ER α 及 ER β 的表达^[8],而雌激素是通过与靶细胞内的雌激素受体作用来发挥功能,因此,可以推测,雌激素对间质干细胞的功能可能具有调节作用。在实验中,我们将成骨诱导 7 d 的成人 MSCs 细胞经雌激素处理 24h 后,发现其 BMP-2 mRNA 的转录明显高于未处理组。由于 BMP-2 本身具有强大的成骨诱导能力,它在体外和体内对 MSCs 细胞均具有很强的促成骨细胞分化作用。可见,在雌激素的作用下,间质干细胞合成 BMP-2 增加,而 BMP-2 又会促进细胞自身和周围的 MSCs 细胞向成骨细胞分化,从而发挥雌激素的促成骨作用。

综合上述的实验结果可以看出,雌激素治疗骨质疏松症的机制除了其抑制破骨细胞的骨吸收作用外,它的促成骨作用也是另一重要方面。雌激素分泌入血液,通过循环到达骨骼系统,与靶细胞 MSCs 内的雌激素受体作用,促进细胞转录并合成 BMP-2, BMP-2 在局部以自分泌或旁分泌的方式进而促进 MSCs 细胞向成骨细胞分化,从而发挥雌激素的促成骨作用。

[参 考 文 献]

- [1] Lyons KM, Pelton RW, Hogan BL. Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A)[J]. *Development*, 1990, 109(4): 833-844.
- [2] Wozney JM, Rosen V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair[J]. *Clin Orthop*, 1998, 346(1): 26-37.
- [3] Tobias JH, Compston JE. Does estrogen stimulate osteoblast function in postmenopausal women? [J]. *Bone*, 1999, 24(2): 121-124.
- [4] Samuels A, Perry MJ, Tobias JH. High-dose estrogen induces de novo medullary bone formation in female mice [J]. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(2): 178-186.
- [5] Zhou H, Shen V, Dempster DW, et al. Continuous parathyroid hormone and estrogen administration increases vertebral cancellous bone volume and cortical width in the estrogen-deficient rat [J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(7): 1300-1307.
- [6] Mathieu E, Merregaert J. Characterization of the stromal osteogenic cell line MN7: mRNA steady-state level of selected osteogenic markers depends on cell density and is influenced by 17 beta-estradiol [J]. *J Bone Miner Res*, 1994, 9(2): 183-192.
- [7] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [8] Zhou S, Zilberman Y, Wassermann K, et al. Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice [J]. *J Cell Biochem*, 2001, 36(s): 144-155.
- [9] Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, et al. *In vitro* cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis [J]. *PNAS*, 2002, 99(7): 4397-4402.
- [10] Wang ML, Nesti LJ, Tuli R, et al. Titanium particles suppress expression of osteoblastic phenotype in human mesenchymal stem cells [J]. *J Orthop Res*, 2002, 20(6): 1175-1184.
- [11] Yang M, Zhu S, Chen Y, et al. Studies on bone marrow stromal cells affinity of poly 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(7-8): 1365-1373.
- [12] Itoh H, Ebara S, Kamimura M, et al. Experimental spinal fusion with use of recombinant human bone morphogenetic protein 2 [J]. *Spine*, 1999, 24(14): 1402-1405.
- [13] Xiao G, Gopalakrishnan R, Jiang D, et al. Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells [J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(1): 101-110.
- [14] Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, et al. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats [J]. *J Orthop Res*, 2003, 21(1): 44-53.
- [15] 徐小良, 汤亭亭, 戴尅戎, 等. 骨形态发生蛋白 2 基因转染的骨髓间充质干细胞修复羊胫骨干骨缺损 [J]. *中华骨科杂志*, 2004, 24(6): 364-367.