

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.11.003

地塞米松影响大鼠成骨细胞脂质分化相关基因表达的实验观察*

宋丽君¹,刘 军²,魏 波²,郭伟雄²,胡资兵²,向 昊²,孙 欣²,彭智恒²,孙杰聪²,文琳钊²
(广东医科大学附属医院:1.生殖医学中心;2.骨科,广东湛江 524001)

[摘要] **目的** 探讨地塞米松作用下成骨细胞脂质分化及成骨相关基因的表达变化特点。**方法** 将 SD 大鼠颅骨成骨细胞作为研究对象,观察在应用不同浓度的地塞米松、甘珀酸分别作用于成骨细胞,其脂质与成骨分化标志基因、成骨标志基因的表达变化。**结果** 应用地塞米松后成骨细胞内发生脂质积聚,成脂分化标志基因 PPAR γ 、C/EBP α 表达上调,成骨相关的 runx2、Col. 1、OPG 相关基因无上调改变。应用甘珀酸后未见上述基因表达的逆转改变。**结论** 成骨细胞在受到皮质激素作用后可产生脂质异常积聚,可能与其 PPAR γ 、C/EBP α 表达上调有关。

[关键词] 成骨细胞;脂质积聚;基因表达

[中图法分类号] R78 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)11-1810-03

Experimental observation of dexamethasone for influencing rat osteoblast lipid differentiation related gene expression*

SONG Lijun¹, LIU Jun², WEI Bo², GUO Weixiong², HU Zibing², XIANG Hao²,
SUN Xin², PENG Zhiheng², SUN Jiecong², WEN Linzhao²
(1. Reproductive Centre, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524001, China; 2. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the rat osteoblast lipid differentiation under dexamethasone action and osteogenesis related gene expression change characteristics. **Methods** The cranial osteoblasts, of SD rats were adopted as the study objects. The lipids and osteogenesis differentiation marker gene were observed after different concentrations of dexamethasone acting on osteoblasts and under the status of carbenoxolone use, as well as the expression change of osteoblast marker gene, and their relationship was analyzed. **Results** The lipid deposition occurred within osteoblasts after using dexamethasone. The expressions of adipogenic differentiation marker genes PPAR γ and C/EBP α were up regulated, while the osteoblastic related genes (runx2, Col. 1 and OPG) had no up regulation change. The reversing change of above genes expressions was not found after using carbenoxolone. **Conclusion** Abnormal lipid deposition in osteoblasts could be induced after dexamethasone acting on osteoblasts, which maybe related to the PPAR γ and C/EBP α expression up regulation. The adipogenic differentiation gene expression is not affected by carbenoxolone in vitro.

[Key words] osteoblast; lipid deposition; gene expression

糖皮质激素 (glucocorticoids, GC) 被广泛应用于自身免疫性疾病、炎症性疾病的治疗,遗憾的是伴随激素的应用产生了各种各样的不良反应。骨坏死是其中一种严重的并发症^[1-2]。长期应用 GC 可能导致高脂血症,血清三酰甘油、胆固醇升高,同时它也可诱发骨髓脂肪细胞肥大、增生。大量临床与实验研究表明 GC 诱发的脂质代谢紊乱存在于骨坏死的病理过程中^[3-5]。成骨细胞是 GC 作用的靶组织之一,是维持骨质平衡与代谢稳定的主要结构。适宜的 GC 水平在骨的发育与维持中起着相当重要的作用。靶组织中细胞内 GC 的浓度不仅依赖细胞外激素水平,同时

也依赖于激素的局部代谢。GC 的生物学活性受到 11 β -羟脱氢酶 (11 β -HSD) 的调节,能够催化无活性皮质酮与活性皮质醇相互转换^[6]。成骨细胞能够活化非活性形式的 GC,通过 11 β -HSD1 来调节激素的水平维持良好的内环境。甘珀酸能够抑制 11 β -HSD1 的转换活性。

本文观察在应用活性抑制剂甘珀酸前后,地塞米松 (Dex) 作用于成骨细胞后,对成骨细胞的成脂与成骨分化的标志性基因及成骨细胞标志基因 PPAR γ 、C/EBP α 、runx2、Col. 1、OPG 的表达,初步分析地塞米松对诱发细胞内脂质积聚与基因表达异常之间的关系。

* 基金项目:广东医学院附属医院青年基金资助项目(20501YS011005)。 作者简介:宋丽君(1975—),主任技师,硕士,主要从事干细胞应用方面的研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂 4 月龄 SD 大鼠由广东医学院动物研究中心提供。胰蛋白酶、aMEM、胶原酶(GIBCO)、小牛血清(Biological industries)、碱性磷酸酶试染色剂盒、碱性磷酸酶活性试剂盒(Sigma), RT-PCR kit, RNA-Plus, PCR 荧光试剂(Gibco), 甘珀酸(CBX, Sigma)。

1.2 成骨细胞培养鉴定 拉颈脱臼处死 SD 大鼠, 取出颅骨, 去掉附着的软组织, PBS 液洗净后, 在 aMEM 培养基中剪成约 1 mm³ 大小骨块, 以 1 cm² 密度种植于培养瓶内, 反转培养瓶, 加入 3 mL 含有 20% 胎牛血清的 aMEM 培养液, 培养瓶置于细胞培养箱中 2 h, 待骨植块稍干涸粘于瓶底, 然后翻转培养瓶, 使组织块浸没于培养基中, 待细胞长满后传代(约 12 d), 用相差贴壁法纯化成骨细胞。碱性磷酸酶染色鉴定: 在成骨细胞长满盖玻片后, 用 4 ℃ 10% 甲醛固定, 蒸馏水冲洗, 将 ALP 孵育液直接滴加到盖玻片上, 室温下孵育 30 min, 在相差显微镜下观察。

1.3 实验分组 成骨细胞接种于 6 孔培养板中, 按照所用地塞米松浓度分为 7 个实验组: 空白对照组(加生理盐水), A 组(Dex 1×10⁻⁸ mol/L), B 组(Dex 1×10⁻⁷ mol/L), C 组(Dex 1×10⁻⁶ mol/L), D 组(Dex 1×10⁻⁸ mol/L+CBX), E 组(Dex 1×10⁻⁷ mol/L+CBX), F 组(Dex 1×10⁻⁶ mol/L+CBX), CBX 剂量为 8×10⁻⁷ mol/L, 所有组作用 6 h。

1.4 总 RNA 提取及 Real-time PCR 分析 总 mRNA 提取: 按照 RNA-Plus 试剂盒(Gibco)说明从成骨细胞提取总 RNA。所得沉淀溶解于 DEPC 溶液, 取 2 μL 稀释至 100 μL, 紫外分光光度计测定 RNA 含量及 OD 值。剩余部分存放于-80 ℃以备逆转录。

逆转录: 取细胞 RNA 样本, 根据上述 mRNA 的含量计算 1 μg mRNA 所需的适量 RNA 体积, 加入: 5×g DNA Eraser Buffer 2 μL+gDNA Eraser 1 μL+适量 DEPC 水构成 10 μL 体系, 室温下放置 5 min, 将上述反应液 10 μL 加入: 5×PrimeScript Buffer 4 μL+ PrimeScript® Enzyme 1 μL+RT Primer Mix 1 μL+DEPC 水 4 μL 直至 20 μL, 反应条件为: 37 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 s, 4 ℃ 下保存。最终得到的 cDNA 放置于-20 ℃冰箱中保存以备下一步 PCR 反应过程。

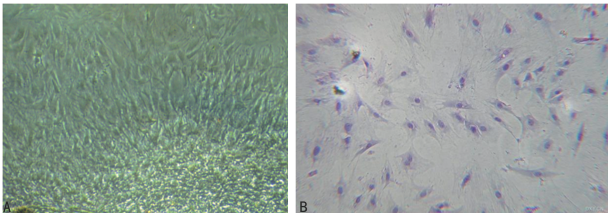
Real-time PCR: 应用 LightCycler® 480PCR 反应系统检测 11β-HSD1, PPAR, C/EBPα, RUX2, C/EBP)α mRNA 表达。β-actin 作为内参引物。反应体系包含 10 μL TaqMan 通用 PCR 反应液, 2 μL 引物, 2 μL TaqMan 探针及 2 μL cDNA。反应条件为: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 退火 15 s, 72 ℃ 延伸 32 s, 共 40 个循环。按照试剂盒说明根据测得 Ct 值计算出≥Ct 值, ΔCt 目的基因 Ct-内参 Ct; ΔΔCt 待测样品中目的基因ΔCt-参照样品中目的基因ΔCt; 相对表达量 = -ΔΔCt。引物: 11-HSD1, 正向: 5'-CT-CAGCTATGTGGTCCTGAGC-3', 反向: 5'-AATGGT-

GGAAAAGAACCCATC-3'; C/EBPα, 正向: 5'-GTCG-GTGGATAAGAACAGCAAC-3', 反向: 5'-CTGGTCAA CTCCAACACCTTCT-3'; PPARr, 正向: 5'-GT GGCT-GCTATAATTTGCTGTG-3', 反向: 5'-GGAGTT TT-GGGAAGAGAAAGGT-3'; runx2, 正向: 5'-CCATA-ACGG TCTTCACAAATCC-3', 反向: 5'-GCGGGA-CACCTACTCTCATACT-3'; β-Actin, 正向: 5'-CAC-CCGCGAGTACAACCTTC-3', 反向: 5'-CCCATAC-CCACCATCACACC-3'。

1.5 统计学处理 用 SPSS11.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐采用方差分析及 LSD 检验, 不齐则用 Welch 近似方差分析及 Dunnett T 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

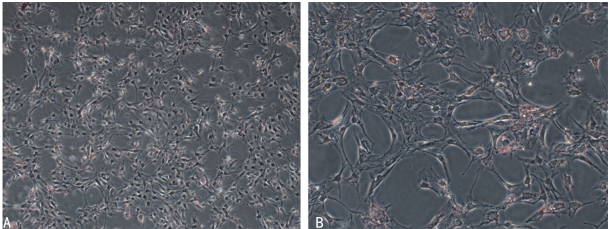
2 结 果

2.1 成骨细胞分离培养鉴定 见图 1。



A: 第二代成骨细胞(×40); B: 细胞碱性磷酸酶染色阳性
图 1 成骨细胞分离鉴定

2.2 成骨细胞内脂质沉积 油红 O 染色显示, 地塞米松(1×10⁻⁷ mol/L)作用后成骨细胞细胞质内出现散在红染的均匀颗粒, 细胞质内有脂质形成与积聚。见图 2。



A: (×40); B: (×200)
图 2 激素作用后成骨细胞油红染色

表 1	分离 RNAs 浓度及 OD 值($\bar{x} \pm s$)	
组别	RNA(μg/mL)	OD _{260/280}
对照组	5.25±1.69	1.74±0.26
A 组	6.40±1.81	1.85±0.22
B 组	4.64±1.73	1.61±0.35
C 组	5.42±1.52	1.75±0.34
D 组	6.55±1.95	1.63±0.31
E 组	5.87±1.63	1.93±0.24
F 组	7.34±2.09	1.77±0.29

2.3 mRNA 分析 所分离获得的 RNA OD 值为 1.7~2.0, 表明 RNA 含量稳定, 可以用于下一步 RNA 分析(表 1)。RT-PCR 分析, 当地塞米松由低浓度向高浓度作用时, PPARγ, C/EBPα RNA 表达上升, runx2 表达下降, 成骨细胞的标志物 OPG 与 I 型胶原表达无明显改变; 应用 11β-HSD1 酶活性抑制剂 CBX 不能改变这种趋势(图 3)。

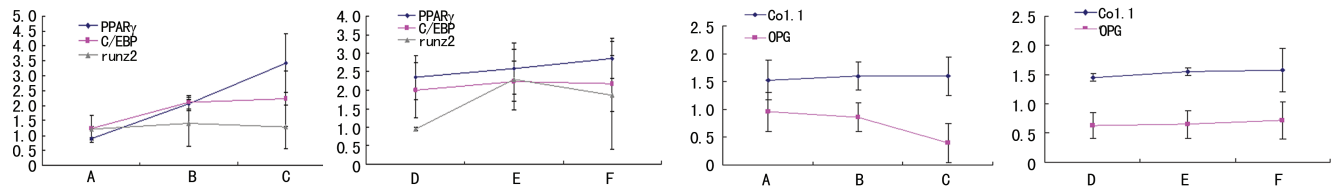


图 3 RT-PCR 法各组基因定量结果分析($\bar{x} \pm s$)

PPAR γ ,C/EBP α RNA 表达在应用地塞米松后上升,A、B、C 组间差异有统计学意义($P<0.05$);应用甘珀酸后表达仍呈上升趋势,高低深度间仍存在统计学差异($P<0.05$),runx2 表达下降。成骨性标志基因表达变化各组间不显著,OPG 在激素组呈略下降趋势,组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨 论

骨坏死是伴随糖皮质激素应用的一种严重并发症。迄今为止对于它们之间的关系与机制研究已开展了大量研究工作。JONES 等^[7]研究认为过量的糖皮质激素可能诱发脂肪肝,引起脂肪栓塞阻塞骨的血管,并最终导致骨坏死。大量的临床与基础研究表明脂质代谢紊乱存在于股骨头坏死的病理过程中^[8]。KAWAI 等^[4]认为发生于股骨头缺坏死的缺血性改变可能是非直接或者是继发的改变,而不是一种原发的原因。接受激素治疗的动物表现出软骨下骨区域骨细胞的脂肪坏死,以及与骨细胞脂肪沉积相平行的渐进性的骨细胞变性。骨细胞脂肪变是骨坏死病理过程中脂质代谢紊乱的一项重要机制。脂质沉积可能发生在激素治疗后的股骨头的各系细胞。随激素应用时间延长,脂质沉积逐渐增加,并且融合成脂滴。细胞核受压、边集,细胞器功能受到干扰,最终导致细胞坏死^[4,9]。这提示骨细胞的脂肪变性是股骨头坏死的一项重要病理改变,是否这一改变的原因是由于成骨细胞发生了转分化(表型改变)? 目前报道较少。成骨细胞表达碱性磷酸酶,OPG, I 型胶原是成熟成骨细胞的标志。本研究中作者发现当应用大剂量的糖皮质激素时,成骨细胞出现脂质积聚改变,成脂肪标志基因 PPAR γ 、C/EBP α 表达显著升高,而成骨性标志基因 runx2 表现下降,这提示在皮质激素诱发的成骨细胞脂质变可能是由于细胞本身发生了表型异常所致。

11 β -HSD1 是一种 NADPH 依赖性酶主要起还原酶活性,在人转换非活性皮质酮为有活性的皮质醇,在啮齿类动物则转换 11 去氢皮质酮为皮质酮,从而扩大了激素的作用。有研究认为地塞米松不能被 11 β -HSD1 转换,仅仅上调其表达^[10-11]。本文发现成骨细胞受地塞米松作用后,出现明显细胞内脂质小滴形成。说明糖皮质激素能够明显诱导成骨细胞内的脂质积聚过程。而地塞米松能够诱导成骨细胞表达成脂分化基因,表现为 PPAR γ ,C/EBP α 随激素浓度递增上升,应用皮质激素活性抑制剂甘珀酸后这种表达增高的趋势未被抑制,而影响成骨分化基因 runx2

则有下降趋势。两种情况下成骨细胞 I 型胶原与 OPG 表达未见显著变化。由此提示地塞米松可能如文献所述不需经过 11 β -HSD1 酶的活性转换,而直接进入细胞起作用。再者地塞米松抑制了该酶的表达,导致内源性皮质激素转换下降,不能有效促进成骨,表现为胶原与 OPG 表达无上升改变。PPAR γ 是维持脂质稳定的重要核受体家族成员。体外研究提示泼尼松能够打破 SD 大鼠 runx2 与 PPAR γ 之间的平衡,破坏成骨与成脂的内在稳定,从而削弱成骨能力^[9-10]。因此作者认为糖皮质激素作用下成骨细胞内的脂质积聚可能是由于诱导了成脂分化性基因表达的结果,但这种脂质调节异常的结果是否直接影响到了成骨细胞的功能与机制,还有待于更深入的研究以获取充分证据。

当 SD 大鼠颅骨成骨细胞在体外受到人工合成的糖皮质激素作用时,表现为细胞内脂滴形成,成脂分化性基因表达增加,成骨相关基因表达下降,酶活性抑制剂不能有效影响这一趋势,提示过量的人工合成皮质激素可能通过改变了成脂分化性基因的表达而使细胞表型发生了改变,抑制了成骨性能,从而成为激素诱发的骨坏死的原因之一,但仍需更深入的研究来阐明详细机制。

参考文献

[1] HUSCHER D, THIELE K, GROMNICA-IHLE E, et al. Dose-related patterns of glucocorticoid-induced side effects[J]. Ann Rheum Dis, 2009, 68(7): 1119-1124.

[2] LI Y H, GAO F Q, CHENG L M, et al. Different changes of microarchitectures of cortical and cancellous bones in sheep femoral head after long-term glucocorticoid interventions[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 9988.

[3] MURATA M, KUMAGAI K, MIYATA N, et al. Osteonecrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: effect of glucocorticoid[J]. J Orthop Sci, 2007, 12(3): 289-295.

[4] KAWAI K, TAMAKI A, HIROHATA K. Steroid-induced accumulation of lipid in the osteocytes of the rabbit femoral head. A histochemical and electron microscopic study [J]. J Bone Joint Surg Am, 1985, 67(5): 755-763.

[5] PU R, PENG H. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases as targets in the treatment of steroid-associated femoral head necrosis using antler extract[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(1): 977-984.

[6] FRIED A, BENAYAHU D. Dexamethasone regulation of marrow stromal-derived osteoblastic cells[J]. J Cell Biochem, 1996, 62(4): 476-483.

(下转第 1816 页)

性,本研究选取了本室自建并保存的结直肠癌细胞株 HT29-Tiam1 和 HT29-Vector 进行了裸鼠皮下成瘤实验,结果显示 Tiam1 基因同样能够显著促进结直肠癌细胞在裸鼠体内的增殖。因此笔者推测,Tiam1 作为增殖调控基因,Tiam1 在正常细胞→过度增殖→恶性转化→肿瘤进展这一演进过程中担任重要的角色。目前已有研究表明,Tiam1 可能通过以下机制发挥其促癌作用:(1)特异性的激活 β -cat 信号转导通路促进细胞的增殖及诱导肿瘤的发生^[13];(2)通过参与 Tiam1-Rac 信号转导通路增强抗凋亡蛋白的合成,从而促进细胞的存活^[14];(3)抑制转录因子 c-myc 的表达,促进细胞增殖,抑制凋亡^[15]。

综上所述,本研究以 Tiam1 转基因小鼠及裸鼠为载体在活体内整体水平探讨了 Tiam1 在细胞增殖调控中的重要作用,具有更高的“真实性”,为细胞增殖研究提供了新的靶点和直接有力的理论依据。随着肿瘤增殖动力学研究的不断深入,Tiam1 对细胞增殖及肿瘤发生发展的相关调控机制必将逐渐被阐明。同时,Tiam1 转基因小鼠作为具有自发高增殖活性的模式动物,能够为细胞增殖与肿瘤演进的深层机制研究提供新的理想平台,推动相关领域的研究进展。

参考文献

- [1] EVAN G I,VOUSDEN K H. Proliferation,cell cycle and apoptosis in cancer [J]. *Nature*,2001,411(6835):342-348.
- [2] MINARD M E,KIM L S,PRICE J E,et al. The role of the guanine nucleotide exchange factor Tiam1 in cellular migration,invasion,adhesion and tumor progression [J]. *Breast Cancer Res Treat*,2004,84(1):21-32.
- [3] MICHIELS F,HABETS G G,STAM J C,et al. A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion [J]. *Nature*,1995(375):338-340.
- [4] RYGIEL T P,MERTENS A E,STRUMANE K,et al. The Rac activator Tiam1 prevents keratinocyte apoptosis by controlling ROS-mediated ERK phosphorylation [J]. *J Cell Sci*,2008(121):1183-1192.

(上接第 1812 页)

- [7] JONES J P,ENGLEMAN E P,NAJARIAN J S. Systemic fat embolism after renal homotransplantation and treatment with corticosteroids[J]. *N Engl J Med*,1965,273(27):1453-1458.
- [8] KAWAI K,MARUNO H,WATANABE Y,et al. Fat necrosis of osteocytes as a causative factor in idiopathic osteonecrosis in heritable hyperlipemic rabbits[J]. *Clin Orthop Relat Res*,1980(153):273-282.
- [9] HU C G,LIU Q,CHEN J C,et al. Cytological changes of femoral head necrosis induced by glucocorticoid[J]. *Chinese J Rehabil*,2006,10(1):97-99.
- [10] HONG D,CHEN H X,GE R S,et al. The biological roles of extracellular and intracytoplasmic glucocorticoids in skeletal cells[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*,2008,111(3/5):164-170.

- [5] YU L N,ZHANG Q L,LI X,et al. Tiam1 transgenic mice display increased tumor invasive and metastatic potential of colorectal cancer after 1,2-dimethylhydrazine treatment [J]. *PLoS One*,2013,8(9):e73077.
- [6] HUANG Z,SUN S,YANG C,et al. TIAM1 inhibits lung fibroblast differentiation in pulmonary fibrosis [J]. *Exp Ther Med*,2017,14(5):4254-4262.
- [7] XU K,TIAN X,OH S Y,et al. The fibroblast Tiam1-osteopontin pathway modulates breast cancer invasion and metastasis [J]. *Breast Cancer Res*,2016,18(1):14.
- [8] BOISSIER P,HUYNH D U. The guanine nucleotide exchange factor Tiam1: a Janus-faced molecule in cellular signaling[J]. *Cell Signal*,2014,26(3):483-491.
- [9] WANG B,LI W,LIU H,et al. miR-29b suppresses tumor growth and metastasis in colorectal cancer via down regulating Tiam1 expression and inhibiting epithelial-mesenchymal transition[J]. *Cell Death Dis*,2014(5):1335.
- [10] LI Z,YU X,WANG Y,et al. By down regulating TIAM1 expression,microRNA-329 suppresses gastric cancer invasion and growth[J]. *Oncotarget*,2015,6(19):17559-17569.
- [11] 雷淑慧,周梅,胡兴胜. Tiam1 在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义[J]. *重庆医学*,2011,31(27):2776-2778.
- [12] 孟庆泽,乔保平,宫珊珊,等. 肾透明细胞癌组织中 T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1 的表达[J]. *郑州大学学报(医学版)*,2012,47(1):66-69.
- [13] LIU L,WU B,CAI H,et al. Tiam1 promotes thyroid carcinoma metastasis by modulating EMT via Wnt/beta-catenin signaling[J]. *Exp Cell Res*,2018,362(2):532-540.
- [14] ZHOU H,KANN M G,MALLORY E K,et al. Recruitment of Tiam1 to semaphoring 4D activates rac and enhances proliferation,invasion,and metastasis in oral squamous cell carcinoma[J]. *Neoplasia*,2017,19(2):65-74.
- [15] HOFBAUER S W,KRENN P W,GANGHAMMER S,et al. Tiam1/Rac1 signals contribute to the proliferation and chemoresistance,but not motility,of chronic lymphocytic leukemia cells[J]. *Blood*,2014,123(14):2181-2188.

(收稿日期:2018-12-03 修回日期:2019-02-19)

- [11] ALAM I,OAKES D K,REILLY A M,et al. Overexpression of WNT16 does not prevent cortical bone loss due to glucocorticoid treatment in mice[J]. *JBM R Plus*,2018,3(4):e10084.
- [12] JIN Q H,ZHANG F,YAN T G,et al. C/EBPalpha regulates SIRT1 expression during adipogenesis[J]. *Cell Res*,2010,20(4):470-479.
- [13] AHMAD F,SOELAIMAN I N,RAMLI E S,et al. Histomorphometric changes in the perirenal adipocytes of adrenalectomized rats treated with dexamethasone[J]. *Clinics (Sao Paulo)*,2011,66(5):849-853.
- [14] CHOI C I. Astaxanthin as a Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) modulator: Its therapeutic implications[J]. *Mar Drugs*,2019,17(4):E242.

(收稿日期:2018-11-27 修回日期:2019-02-09)