

## • 基础研究 •

## 脱氢表雄酮对离体大鼠成骨细胞的影响

李蔚 孙宜萍 朱国英 王莉华

**【摘要】** 目的 探讨脱氢表雄酮(DHEA)对离体大鼠成骨细胞的影响。方法 体外分离培养大鼠成骨细胞,取传一代细胞,分别给予 $10^{-5}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-9}$  mmol/L DHEA培养72h,以 $10^{-8}$  mmol/L雌二醇( $E_2$ )为阳性对照,另设空白对照组。碱性磷酸酶(ALP)染色鉴定成骨细胞,MTT法检测成骨细胞的增殖能力,PNPP法测定ALP活性。行矿化结节染色,低倍镜下测量矿化结节面积并计算面积比,观察DHEA对矿化能力的影响。结果 和空白对照组相比,不同浓度DHEA组成骨细胞增殖能力均有上升,其中以 $10^{-7}$  mmol/L DHEA组最显著( $P < 0.01$ ),其作用和 $E_2$ 相似( $P > 0.05$ );不同浓度DHEA组ALP的活性均升高,亦以 $10^{-7}$  mmol/L DHEA组最显著( $P < 0.01$ ), $10^{-7}$ 、 $10^{-9}$  mmol/L DHEA的作用和 $E_2$ 相似( $P > 0.05$ ); $10^{-9}$  mmol/L DHEA组单位细胞数的ALP活性高于空白对照组( $P > 0.05$ )。不同浓度DHEA组矿化面积及矿化面积比均有显著增加( $P < 0.01$ ),其作用和 $E_2$ 相似。结论 DHEA在体外促进大鼠成骨细胞生长和增殖,提高ALP活性,并促进骨矿化物质在骨内沉积。

**【关键词】** 脱氢表雄酮;成骨细胞;增殖

Effect of dehydroepiandrosterone on rat osteoblasts *in vitro*

LI Wei\*, SUN Yiping, ZHU Guoying, et al

\* Department of Gerontology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

**【Abstract】** Objective To investigate the effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on rat osteoblasts *in vitro*. Methods Rat's osteoblasts were separated and cultured *in vitro*. Osteoblasts of first generation were treated with DHEA at different concentrations ( $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-9}$  mmol/L) for 72 h,  $E_2$  at  $10^{-8}$  mmol/l was adopted as positive control, and blank control group was also set up. The biological characteristics of osteoblasts were evaluated by phase-contrast microscopy and alkaline phosphatase (ALP) histochemistry. Proliferation ability of osteoblasts was examined, activity of ALP was determined, and area and area ratio of mineralized nodes was also measured through low power microscopy after being stained. Results Compared with blank control group, proliferation of osteoblasts treated with DHEA at different concentrations was raised, especially those treated with DHEA  $10^{-7}$  mmol/L ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference between the osteoblasts treated with  $E_2$  and DHEA at different concentrations ( $P > 0.05$ ). ALP activity of the groups treated with DHEA at different concentrations, especially the group treated with DHEA  $10^{-7}$  mmol/L, was higher than that of blank control group ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference between treatment with  $E_2$  and DHEA  $10^{-7}$  and  $10^{-9}$  mmol/L ( $P > 0.05$ ). ALP activity of unit cell population treated with DHEA  $10^{-9}$  mmol/L was higher than that of blank control group ( $P < 0.05$ ). Area and area ratio of mineralized nodes was much higher in groups treated with DHEA at different concentrations ( $P < 0.01$ ) and the effects were similar to that of  $E_2$  ( $P > 0.05$ ). Conclusion DHEA could stimulate the growth and proliferation of rat's osteoblasts *in vitro*, raise ALP activity, and promote the deposition of bone mineral in skeleton.

收稿日期:2007-01-04

基金项目:上海市科委课题(No 034119946)

作者单位:200233 上海市,上海交通大学附属第六人民医院老年病科(李蔚,孙宜萍);200032 上海市,上海复旦大学放射医学研究所(朱国英,王莉华)

作者简介:李蔚,女,1972年10月生,浙江绍兴人,医学学士,在读硕士研究生,主治医师。

通讯作者:孙宜萍, Tel:021-64369181-8475, E-mail:sunyipings@medmail.com.cn

【Key words】 dehydroepiandrosterone; osteoblast; proliferation

脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)在肾上腺皮质网状带细胞中经细胞色素P450c17为主酶催化胆固醇合成,主要以其硫酸盐(DHEA-S)的形式进入血循环。DHEA-S与衰老及老年疾病有关。其抗骨质疏松作用直到上世纪末才日益受到重视,有研究表明,老年原发性骨质疏松患者补充适量DHEA可使骨密度上升<sup>[1,2]</sup>。但是关于DHEA对成骨细胞(osteoblast, OB)调控作用的研究报道甚少,尚不清楚DHEA本身是否对OB具有直接调控效应。本实验旨在阐明DHEA对离体大鼠OB的影响作用。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 1日龄SD新生大鼠(复旦大学放射医学研究所动物房,合格证34),雌雄不拘,用于分离原代OB。

1.2 材料 MEM培养基干粉(GIBCO BRL美国);胎牛血清(GIBCO BRL美国);胶原酶II(Sigma公司);胰蛋白酶(华美生物工程公司);DHEA(为美国Sigma公司产品,配成浓度为 $1 \times 10^{-5}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-9}$  mmol/L);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色试剂盒(Sigma公司)。

### 1.3 大鼠成骨细胞分离培养与鉴定

1.3.1 成骨细胞分离培养(机械分离加酶消化法) 出生24h内的SD大鼠(红皮鼠)10只,自来水冲洗后放入75%乙醇浸泡20s,无菌剪开头部皮肤,手术刀切下颅盖骨,清除骨表面的结缔组织,PBS反复冲洗至骨组织发白,用剪刀将骨组织剪碎至 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 骨片,0.25%胰蛋白酶5 ml 37℃预消化20 min,间歇震荡4~5次。弃消化液,将骨片移入含0.1%II型胶原酶10 ml的玻瓶中,37℃恒温水浴振荡消化60 min。移取消化液,离心1000 rpm $\times$ 10 min,弃上清,加入适量培养液,制成细胞悬液,混匀,以 $1.2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于 $25 \text{ cm}^2$ 培养瓶,置5% CO<sub>2</sub>, 37℃条件下培养24h后换液一次,以后每2d换液一次,细胞汇合后,0.25%胰蛋白酶消化, $1.2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 分瓶接种于 $25 \text{ cm}^2$ 培养瓶,继续培养,汇合后用于测定成骨细胞的增殖及功能等。

1.3.2 碱性磷酸酶染色(偶氮偶联法) 底物、显色剂与缓冲液按1:1:50比例混合配制孵育液,接种

在玻片上的细胞培养1周,2.5%戊二醛4℃固定7min,蒸馏水冲洗,浸入孵育液,37℃条件下孵育60min,蒸馏水冲洗,晾干,中性树胶封片,光镜观察、摄片。

1.3.3 矿化结节染色(茜素红法) 汇合后的OB经含抗坏血酸、 $\beta$ -甘油磷酸钠矿化诱导液培养,形成不透光的矿化结节,茜素红染色鉴定。染色步骤如下:吸弃培养液,PBS洗涤2次,95%乙醇固定10 min,弃乙醇,PBS洗涤2次,加入0.2%茜素红染液2 ml,染色30 min,自来水轻轻冲洗,光镜下观察,计算矿化面积和面积比。

### 1.4 观察指标

1.4.1 成骨细胞增殖能力(MTT法) OB  $1.25 \times 10^6/\text{L}$ 以每孔200  $\mu\text{l}$ 接种于96孔细胞培养板,培养24h后,分为5组,分别为空白对照组、 $1 \times 10^{-8}$  mmol/L 雌激素(estradiol, E<sub>2</sub>)组、 $1 \times 10^{-5}$  mmol/L DHEA组、 $1 \times 10^{-7}$  mmol/L DHEA组和 $1 \times 10^{-9}$  mmol/L DHEA组。培养72h,弃上清液,每孔加无血清MEM培养液100  $\mu\text{l}$ , MTT(二甲基噻唑二苯基四唑溴盐)10  $\mu\text{l}$ , 37℃孵育4h,加入20%的SDS(十二烷基硫酸钠)150  $\mu\text{l}$ , 37℃温育2h,酶标仪570 nm波长检测吸光度值(OD),用样品OD值表示OB增殖能力。

1.4.2 成骨细胞碱性磷酸酶活性(PNPP法) OB  $1.25 \times 10^6/\text{L}$ 以每孔200  $\mu\text{l}$ 接种于96孔细胞培养板,培养24h后分为5组,分别为空白对照组、 $1 \times 10^{-8}$  mmol/L E<sub>2</sub>组、 $1 \times 10^{-5}$  mmol/L DHEA组、 $1 \times 10^{-7}$  mmol/L DHEA组和 $1 \times 10^{-9}$  mmol/L DHEA组。培养72h,弃上清液,PBS冲洗,每孔加PNPP底物150  $\mu\text{l}$ , 37℃孵育30 min,加入0.2 mol/L的NaOH 50  $\mu\text{l}$ 终止反应,酶标仪405 nm波长检测OD,样品OD值表示ALP活性。以ALP的OD值/MTT的OD值比值表示单位细胞数ALP活性。

### 1.4.3 成骨细胞矿化结节形成功能(茜素红染色)

OB  $1.25 \times 10^6/\text{L}$ 以每孔2 ml接种于24孔细胞培养板,分为5组,分别为空白对照组、 $1 \times 10^{-8}$  mmol/L E<sub>2</sub>组、 $1 \times 10^{-5}$  mmol/L DHEA组、 $1 \times 10^{-7}$  mmol/L DHEA组和 $1 \times 10^{-9}$  mmol/L DHEA组。培养至完全汇合后换成含10%矿化诱导液的培养液继续培养,每2d换液一次,继续培养3周,PBS洗涤2次,固定,PBS洗涤2次,加入0.2%茜素红染液2 ml,

染色 30 min, 自来水轻轻冲洗, 光镜下观察。以红染, 边界清晰, 周围有明显细胞堆积, 短径大于 20 $\mu$ m 的标准, 低倍镜下计算每个视野的矿化面积和矿化面积比。每组计算 20 个视野。

1.5 统计学处理 数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS10.0 统计软件进行方差分析。

## 2 结果

2.1 成骨细胞形态学分析 原代细胞培养第 2 天, 见 OB 贴壁展开呈多种形态。培养 3~5d, 细胞体积增大, 见较多细胞分裂相; 胞浆丰富, 向外伸展, 伸出多个伪足, 与周围细胞的伪足相互连结, 细胞半融合。培养 1 周左右, 细胞融合成铺路石状。OB 的鉴定: ALP 染色成阳性, 可见胞质内蓝紫色阳性颗粒, 核不着色, 位于细胞一侧, 可见 1~2 个核仁。以胞浆呈明显蓝紫色颗粒为阳性细胞, 无着色或和背景一致为阴性细胞。原代培养的细胞纯率(指 ALP 染色的细胞与所有细胞的百分率)超过 90%(纯率低于 90%, 说明原代培养的 OB 中含有其他细胞较多, 将影响实验的准确性), 符合本研究的要求(图 1)。

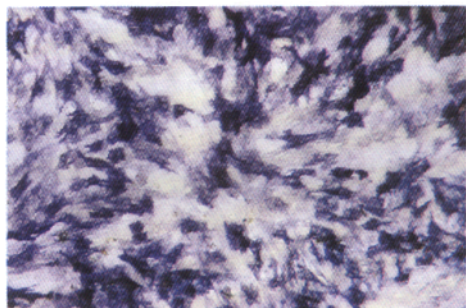


图 1 成骨细胞碱性磷酸酶染色( $\times 100$ )

2.2 不同浓度 DHEA 对成骨细胞增殖能力、碱性磷酸酶活性的影响(表 1) 和空白对照组相比, 不同浓度的 DHEA 均能提高 OB 增殖能力, 其中以  $10^7$  mmol/L

DHEA 组最显著 ( $P < 0.01$ ); 不同浓度的 DHEA 对细胞增殖的影响和  $E_2$  相仿 ( $P > 0.05$ )。和空白对照组相比, 不同浓度的 DHEA 均能使 ALP 活性升高, 其中以  $10^7$  mmol/L DHEA 组升高最明显 ( $P < 0.01$ ),  $10^5$  mmol/L DHEA 对 ALP 活性的影响无统计学意义 ( $P > 0.05$ );  $10^7$ 、 $10^9$  mmol/L DHEA 对 ALP 活性的影响和  $E_2$  相仿 ( $P > 0.05$ )。和空白对照组相比, 虽  $E_2$  和  $10^7$ 、 $10^9$  mmol/L DHEA 组单位细胞数 ALP 活性提高, 但其中仅  $10^9$  mmol/L DHEA 组有统计学意义 ( $P < 0.05$ );  $10^9$  mmol/L DHEA 组单位细胞数 ALP 活性较  $E_2$  组升高 ( $P < 0.05$ )。

2.3 不同浓度 DHEA 对成骨细胞矿化结节形成功能的影响(表 2) 与对照组相比, 不同浓度的 DHEA 组矿化面积及矿化面积比显著增加 ( $P < 0.01$ ); 不同浓度 DHEA 组和  $E_2$  组相比, 矿化面积及矿化面积比无显著差异 ( $P > 0.05$ )。矿化结节照片见图 2~4。

表 2 各组成骨细胞矿化结节矿化面积及矿化面积比

组别	矿化面积( $\mu\text{m}^2$ ) $\times 10^5$	矿化面积比
空白对照组	0.8851 $\pm$ 0.4559	6.5113 $\pm$ 3.3540
$10^8$ mmol/L $E_2$ 组	1.3901 $\pm$ 0.5978*	10.2264 $\pm$ 4.3977*
DHEA		
$10^5$ mmol/L 组	1.3190 $\pm$ 0.2879*	9.7035 $\pm$ 2.1177*
$10^7$ mmol/L 组	1.4494 $\pm$ 0.4963*	10.6627 $\pm$ 3.6513*
$10^9$ mmol/L 组	1.4607 $\pm$ 0.4214*	10.7452 $\pm$ 3.1001*

注: 与空白对照组比较, \*  $P < 0.01$

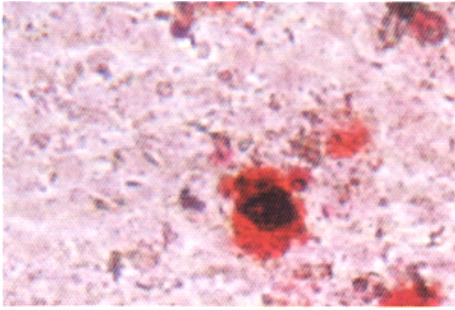
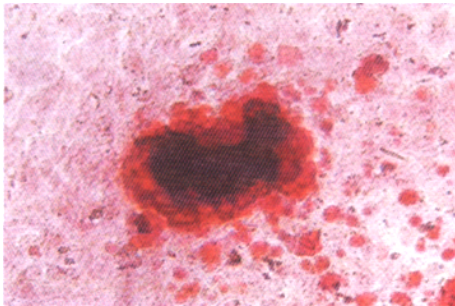
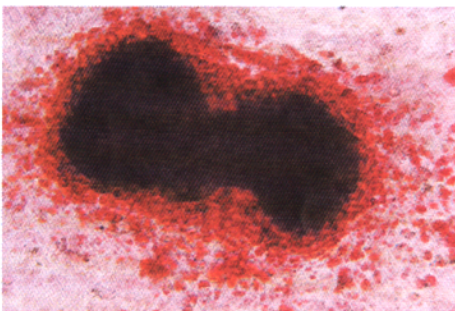
## 3 讨论

骨代谢的主要形式是骨重建, 一切影响破骨细胞和 OB 数目和功能的因素, 都与骨质疏松的发生有关。DHEA 作为体内性激素的前体物质, 可在不同的性别中协调地转换成不同比例的性激素, 达到体内性激素的平衡。循证研究表明, 对绝经后女性和老年男性骨质疏松患者补充一定剂量的 DHEA 后,

表 1 各组成骨细胞碱性磷酸酶活性及增殖能力比较

组别	细胞增殖能力	ALP 活性	单位细胞数 ALP 活性
空白对照组	0.380 $\pm$ 0.026	0.574 $\pm$ 0.059	1.488 $\pm$ 0.156
$10^8$ mmol/L $E_2$ 组	0.440 $\pm$ 0.023 <sup>#</sup>	0.669 $\pm$ 0.072 <sup>#</sup>	1.506 $\pm$ 0.144
DHEA			
$10^5$ mmol/L 组	0.427 $\pm$ 0.034*	0.600 $\pm$ 0.036	1.444 $\pm$ 0.141
$10^7$ mmol/L 组	0.457 $\pm$ 0.071 <sup>#</sup>	0.723 $\pm$ 0.040 <sup>#</sup>	1.638 $\pm$ 0.245
$10^9$ mmol/L 组	0.438 $\pm$ 0.051*	0.649 $\pm$ 0.059*	1.741 $\pm$ 0.150*

注: 与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ , <sup>#</sup>  $P < 0.01$

图2 对照组矿化结节( $\times 100$ )图3 E<sub>2</sub>组矿化结节( $\times 100$ )图4  $10^{-7}$  mmol/L DHEA组矿化结节( $\times 100$ )

胰岛素样生长因子-I (insulin-like growth factor-I, IGF-I)可使骨密度上升。也有实验证明 DHEA 可在体外抑制小鼠 OB 凋亡<sup>[3]</sup>。所以本实验旨在探讨 DHEA 对离体大鼠成骨细胞的增殖作用,为 DHEA 应用于骨质疏松的防治提供理论依据。

由于原代培养的 OB 在体外实验中比人 OB 株更具有代表性<sup>[4]</sup>,因此本研究采用了原代培养的 OB 作为研究对象。ALP 染色鉴定本研究原代分离培养的 OB,纯率在 90% 以上,符合要求。ALP 是检测骨形成的常用指标之一,ALP 升高是骨转换增

加的结果。本研究结果显示,不同浓度的 DHEA 均可促进 OB 增殖,并提高 ALP 活性,尤以  $10^{-7}$  mmol/L DHEA 组更为明显,其作用和 E<sub>2</sub> 组相仿。低浓度 DHEA ( $10^{-9}$  mmol/L)使单位细胞数 ALP 活性升高,而  $10^{-5}$  和  $10^{-7}$  mmol/L DHEA 此作用不明显。茜素红染色结果显示,不同浓度 DHEA 处理组矿化面积和矿化面积比显著增加。提示 DHEA 和 E<sub>2</sub> 一样,都能使骨矿化物质在骨内沉积。

已有研究证明,DHEA 的正常生理浓度为  $0.001\sim 0.03\mu\text{mol/L}$ <sup>[5]</sup>,这和本实验结果所提示的无论是对 OB 增殖还是对于 ALP 活性,最佳浓度均是  $10^{-7}$  mmol/L $\sim 10^{-9}$  mmol/L 相一致。高浓度水平  $10^{-5}$  mmol/L 不利于 OB 增殖。

性激素在调节骨质量和骨转换中起重要作用。骨母细胞存在雄激素受体 (androgen receptor, AR),DHEA 在骨母细胞经  $3\beta$ -羟甾脱氢作用形成雄烯二酮,然后经芳香化酶的作用进一步转化为雌酮、E<sub>2</sub>。业已证明雌激素具有抗骨质疏松作用。Takayanagi 等<sup>[6]</sup>体外培养的人 OB 实验表明 DHEA 可被细胞内芳香化酶转化为雌激素而发挥维持骨密度作用。多家报道认为雄激素缺乏是老年男性骨质疏松症的主要原因。雄激素能通过 OB 上的 AR 促进 OB 增殖,合成与分泌多种细胞因子,促使骨基质蛋白和胶原形成,保证骨矿化物质在骨内沉积。目前认为,男性睾酮对骨量的影响可能是通过在骨内代谢为双氢睾酮 (dihydrotestosterone, DHT)或直接经芳香化酶转化为雌激素,促进 OB 增殖。老年男性原发性骨质疏松症患者雌激素水平降低,可能与芳香化酶不足或活性下降有关<sup>[7]</sup>。

雄激素还具有独立于芳香化酶通路以外的效应。除 AR 外,雄激素对骨的作用还可通过雌激素受体  $\alpha$  介导,二者之间的相互影响迄今尚不清楚<sup>[8]</sup>。雄激素对维持骨量有重要意义,但由 DHT 引发的 AR 转活却可以增加再育的成骨细胞前体和成熟的骨细胞凋亡。DHT 通过对转录后水平的调控作用于细胞凋亡调节基因 Bcl-2 (具有抗凋亡作用)和 Bax (具有促凋亡作用),消除局部的干扰 RNA,导致 Bcl-2 表达下降,Bax 表达升高,Bax/Bcl-2 比值上升,从而促进 OB 凋亡。所以,与雌激素不同,雄

激素对骨代谢存在双相作用,对维持骨骼的自身稳定有重要的意义<sup>[9]</sup>。

体外实验发现 DHEA 可刺激 IGF- I mRNA 的表达,提高 IGF- I 的浓度<sup>[10]</sup>。IGF- I 对参与骨转换的所有细胞均具有刺激有丝分裂和(或)启动分化的活性,尤其增加 OB 数目和功能<sup>[11]</sup>。王玉东等实验结果提示,DHEA 可促进小鼠 OB 生长和增殖,抑制其凋亡<sup>[3]</sup>,这和本研究结果相一致。进一步研究发现其机制为 DHEA 能促进磷酸化 p44/42 的表达,因而可以认为 DHEA 能激活丝裂活化蛋白激酶途径介导 OB 的增殖<sup>[12]</sup>。

体外实验证实 DHEA 还可以增进 OB 对骨保护素(osteoprotegerin,OPG)/ NF-κB 受体活化因子的配体(receptor activator of NF-κB ligand,RANKL)的表达,而且只有当 OB 存在时,DHEA 可以抑制破骨细胞的骨吸收作用。雌激素除促进 OB 表达 OPG mRNA外,还可抑制转录因子 c-Jun 的水平和功能,使 JNK 不能被激活,从而抑制破骨细胞的分化<sup>[13]</sup>。RANKL, RANK 和 OPG 三者构成了对破骨细胞分化、活化与凋亡的三角调节关系<sup>[14]</sup>。

综上所述,本研究结果提示 DHEA 和雌激素一样能促进 OB 的增殖,提高 ALP 活性,并促使骨矿化物质在骨内沉积。这为 DHEA 在老年骨质疏松的临床应用提供了细胞水平基础理论依据,但其详细的分子调控机制尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Gordon CM, Grace E, Emans SJ, et al. Changes in bone turnover markers and menstrual function after short-term oral DHEA in young women with anorexia nervosa. *J Bone Miner Res*, 1999, 14: 136-145.

[2] Sun Y, Mao M, Sun L, et al. Treatment of osteoporosis in men using dehydroepiandrosterone sulfate. *Chin Med J (Engl)*, 2002, 115: 402-404.

[3] 王玉东, 罗来敏, 童剑倩, 等. 脱氢表雄酮抑制成骨细胞凋亡的实验研究. *中华妇产科杂志*, 2005, 40: 844-845.

[4] Harbour ME, Gregory JW, Jenkins HR, et al. Proliferative response of different human osteoblast-like cell models to proinflammatory cytokines. *J Pediatr Res*, 2000, 48: 163-168.

[5] Lee KS, Oh KY, Kim BC. Effects of dehydroepiandrosterone on collagen and collagenase gene expression by skin fibroblasts in culture. *J Dermatol Sci*, 2000, 23: 103-110.

[6] Takayanagi R, Goto K, Suzuki S, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) as a possible source for estrogen formation in bone cells; correlation between bone mineral density and serum DHEA-sulfate concentration in post menopausal women, and the presence of aromatase to be enhanced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human osteoblasts. *J Mech Aging Dev*, 2002, 123: 1107-1114.

[7] Van Pottelbergh J, Goemaere S, Kaufman JM. Bioavailable estradiol and an aromatase gene polymorphism are determinants of bone mineral density changes in men over 70 years of age. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88: 3075-3081.

[8] Lindberg MK, Vandenput L, Moverare Skrtic S, et al. Androgens and the skeleton. *J Minerva Endocrinol*, 2005, 30: 15-25.

[9] Wren KM, Toombs AR, Semirale AA, et al. Osteoblast and osteocyte apoptosis associated with androgen action in bone; requirement of increased Bax/Bcl-2 ratio. *J Bone*, 2006, 38: 637-651.

[10] Ribeiro MF, Garcia-Segura LM. Dehydroepiandrosterone regulates insulin-like growth factor-1 system in adult rat hypothalamus. *Endocrine*, 2002, 17: 129-134.

[11] Hock JM, Centrella M, Canalis E. IGF-I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *J Endocrinol*, 1988, 122: 254-259.

[12] 王玉东, 李大金, 袁敏敏, 等. 脱氢表雄酮通过丝裂活化蛋白激酶途径促进成骨细胞增殖的研究. *中华老年医学杂志*, 2004, 23: 867-870.

[13] Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, et al. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 7829-7834.

[14] Gonzales EA. The role of cytokines in skeletal remodeling; possible consequences for renal osteodystrophy. *J Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15: 945-950.