

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.10.002

文章编号: 1005-8982(2016)10-0006-05

论著

高胆固醇对小鼠原代成骨细胞 Akt/NF- κ B 信号通路的影响

邓莉, 宋丹

(湖北省丹江口市第一医院 检验科, 湖北 丹江口 442700)

摘要: **目的** 观察高胆固醇对原代成骨细胞 Akt/NF- κ B 信号通路的影响。**方法** 将小鼠原代成骨细胞按 1×10^5 接种于 6 孔板上, 待细胞融合至 80% 左右, 分别加入 0 μ g/ml、12.5 μ g/ml、25 μ g/ml 和 50 μ g/ml 的胆固醇溶液培养基继续培养 24 h。采用蛋白质免疫印迹法(Western blot)的方法, 检测成骨细胞核转录因子 kappa B (NF- κ B) 和蛋白激酶 B(Akt) 的蛋白表达; 采用实时荧光定量 PCR 方法, 检测成骨细胞中人白细胞介素 1 α (IL-1 α)、人白细胞介素 6(IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的信使 RNA(mRNA) 表达; 采用酶联免疫吸附法, 检测细胞培养上清中 IL-1 α 、IL-6 和 TNF- α 的蛋白水平。**结果** 胆固醇诱导成骨细胞中 NF- κ B 的增加和 Akt 磷酸化水平降低, 增加 IL-1 α 、IL-6 与 TNF- α 的 mRNA 和蛋白表达, 且呈一定的剂量依赖性。**结论** 高胆固醇可以通过 Akt/NF- κ B 信号通路及其介导的炎症因子表达参与成骨细胞的调节。

关键词: 成骨细胞; NF- κ B; Akt; 胆固醇

中图分类号: R589.9; R-332

文献标识码: A

Effects of high-level cholesterol on Akt/NF- κ B signaling pathway of mouse primary osteoblasts

Li Deng, Dan Song

(Department of Laboratory, Danjiangkou First Hospital, Danjiangkou, Hubei 442700, China)

Abstract: Objective To observe the effects of high-level cholesterol on Akt/NF- κ B signaling pathway of primary osteoblasts. **Methods** Mouse primary osteoblasts were seeded at 1×10^5 to 6-well plates. At 80% fusion, the cells were stimulated with 0 μ g/ml, 12.5 μ g/ml, 25 μ g/ml and 50 μ g/ml cholesterol solution culture medium respectively for 24 hours. The protein levels of NF- κ B and phosphorylation of Akt were detected by Western blot. The levels of IL-1 α , IL-6 and TNF- α were detected by RT-qPCR and ELISA. **Results** High-level cholesterol increased the NF- κ B protein level and decreased phosphorylation of Akt. High-level cholesterol increased not only the mRNA levels but also protein levels of IL-1 α , IL-6 and TNF- α . **Conclusions** Together, these results have uncovered a role of cholesterol in osteoblasts and provided the evidence that treatment with cholesterol at a high dosage may influence the levels of inflammatory factors through Akt/NF- κ B signaling pathway in osteoblasts.

Keywords: osteoblast; NF- κ B; AKT; cholesterol

胆固醇水平与骨质疏松直接相关^[1-3], 高胆固醇血症增加骨吸收、降低骨形成^[4]。高胆固醇与原发性

骨质疏松有一定关系, 如对绝经期、老年性原发性骨质疏松患者激素替代治疗可以减少骨质流失, 提高骨

收稿日期: 2015-10-26

密度,同时可见胆固醇降低^[5-7]。高胆固醇对继发性骨质疏松也有一定的作用,如糖皮质激素导致的股骨头坏死可见胆固醇升高^[8],胆固醇升高还可作为前列腺癌骨转移的临床指标^[9]。胆固醇及其代谢产物可以抑制成骨细胞活性、降低骨盐沉积最终导致骨质疏松^[10-11]。他汀类药物可降低血清胆固醇,刺激骨形成、减少骨流失,与骨形态发生蛋白 2 基因 (bone morphogenetic protein 2, BMP2 基因) 表达增加有关,适当剂量的他汀类药物可用于治疗骨质疏松^[12]。成骨细胞对骨组织的生长发育、骨代谢平衡、骨量平衡和骨损伤修复有着关键作用。因此,在高胆固醇血症导致骨质疏松病理生理过程中,其对成骨细胞的影响起着重要作用。本实验利用原代成骨细胞体外培养观察高胆固醇对 Akt/NF- κ B 信号通路的影响从而探讨高胆固醇诱导骨质疏松发生的作用和可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 一般材料

C57BL/6 小鼠购自重庆医科大学实验动物中心。DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 均购自美国 Gibco 公司, RNA 提取试剂 Trizol 和荧光试剂 SYBR Premix Ex Taq™ II 均购自日本 TaKaRa 公司, 蛋白提取试剂 RIPA、PMSF、NaF、Na₃VO₄ 和 BCA 蛋白测定试剂均购自上海碧云天生物技术有限公司, NF- κ B 抗体购自美国 Abcam 公司, 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 及 p-Akt 抗体均购自美国 CST 公司, β -actin 抗体、HRP 标记二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。IL-1 α 、IL-6 和 TNF- α 酶联免疫试剂盒购自晶美生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠成骨细胞的培养及鉴定 取 20 只出生 24 h 内的小鼠, 引颈处死, 75% 酒精浸泡 10 min。无菌的条件下取出颅盖骨浸泡在 D-Hanks 液中。分别剪成 0.1 mm \times 0.1 mm \times 0.1 mm 的组织块, 加入 10 ml 0.25% 的胰蛋白酶溶液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。加入 0.2% 胶原酶 10 ml, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 每 5 min 震荡 1 次。1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。用 DMEM 培养基冲洗 3 次。200 目滤网过滤去除骨碎片。收获细胞以完全培养基 (含 10% 胎牛血清、100 u/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养液) 重悬, 吹打均匀, 接种至多个 25 cm² 培养

瓶。放入 37 $^{\circ}$ C, 5% 二氧化碳 CO₂ 培养箱培养。每 48 h 换液 1 次, 细胞融合成单层至 80% 以上时, 0.25% 胰酶消化制成细胞悬液, 采用差速贴壁法进行成骨细胞纯化。倒置相差显微镜观察细胞形态变化, 碱性磷酸酶活性检测鉴定成骨细胞。

1.2.2 细胞处理分组 实验中细胞主要按照以下分组进行处理, 收集第 4 代细胞进行实验, 将原代成骨细胞按 1 \times 10⁵ 接种于 6 孔板上。将胆固醇溶于乙醇溶液, 待细胞生长至 80% 融合状态时加入不同浓度的胆固醇溶液, 胆固醇终浓度为 0 μ g/ml, 12.5 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 乙醇浓度为 0.25%, 对照组为只含有 10% FBS 的 DMEM 培养基。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-PCR) 细胞按上述分组进行处理, 用不同浓度胆固醇溶液培养基培养 24 h, 离心管收集培养上清液备用, 用预冷的 PBS 洗涤细胞两次, 用 Trizol 法提取原代成骨细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA。采用 RT-PCR 检测目的基因, 用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 值计算目的基因的相对表达量。其中人白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6) 基因引物正向序列: 5'-GAAATC GTGGAATGAG-3'; 反向: 5'-TAGGTTTGCCGAGTAGA-3'。肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor α , TNF- α) 基因正向引物: 5'-CTGTGAAGGGAATGGGTGTT-3'; 反向: 5'-CAGGGAAGAATCTGGAAAGGTC-3'。人白细胞介素 1 α (interleukin 1 α , IL-1 α) 基因引物正向序列: 5'-CTCTAGAGCACCATGCTACAG-3'; 反向: 5'-TTGGAATCCAGGGGAAACACT-3'。内参 β -actin 基因引物正向序列: 5'-GCTGTCCCTGTATG CCTCT-3'; 反向: 5'-GATGTCACGCACGATTTCC-3'。

1.2.4 酶联免疫分析 (Elisa) 采用酶联免疫试剂盒, 按试剂说明进行检测, 酶标仪测定 450 nm 波长处光密度 (optical density, OD) 值, 以标准品浓度和 OD 值作标准曲线, 样品浓度根据标准曲线得出。

1.2.5 蛋白质免疫印迹分析 (Western blot) 提取原代成骨细胞蛋白并用 BCA 法测定蛋白浓度。取 60 μ g 蛋白上样, SDS-PAGE 电泳分离蛋白后转膜到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗 3 次, HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次后加 ECL 试剂反应, 显像、成像。用目的条带与 β -actin 的灰度值比较表示目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用单因素

ANOVA 分析, 用 LSD-*t* 检验或 SNK-*q* 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胆固醇对成骨细胞 IL-1 α 、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达的影响

按上述方法分离小鼠原代成骨细胞进行碱性磷酸酶活性检测鉴定, 可见大量染色阳性细胞, 细胞膜及细胞浆内颗粒染色呈蓝黑色颗粒, 鉴定结果见图 1。成功分离的成骨细胞接种 6 孔板, 并用不同浓度的胆固醇刺激成骨细胞 24 h, 实时荧光定量 PCR 测定 IL-1 α 、IL-6 和 TNF- α mRNA 表达。0 μ g/ml 组与对照组比较各类炎症因子的表达基本无变化, 说明酒精溶酶基本不影响本实验中炎症因子的表达。

不同浓度胆固醇显著诱导 IL-1 α 、IL-6 及 TNF- α 的 mRNA 水平, 且呈现一定的剂量依赖性, 见图 2。本结果提示在成骨细胞中胆固醇与炎症因子 IL-1 α 、IL-6 和 TNF- α 的 mRNA 水平呈正相关。

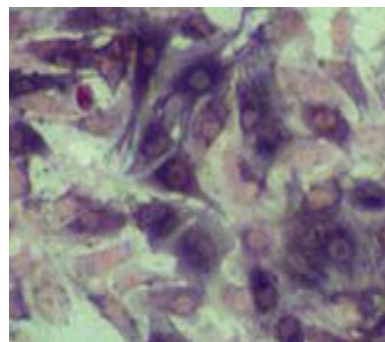
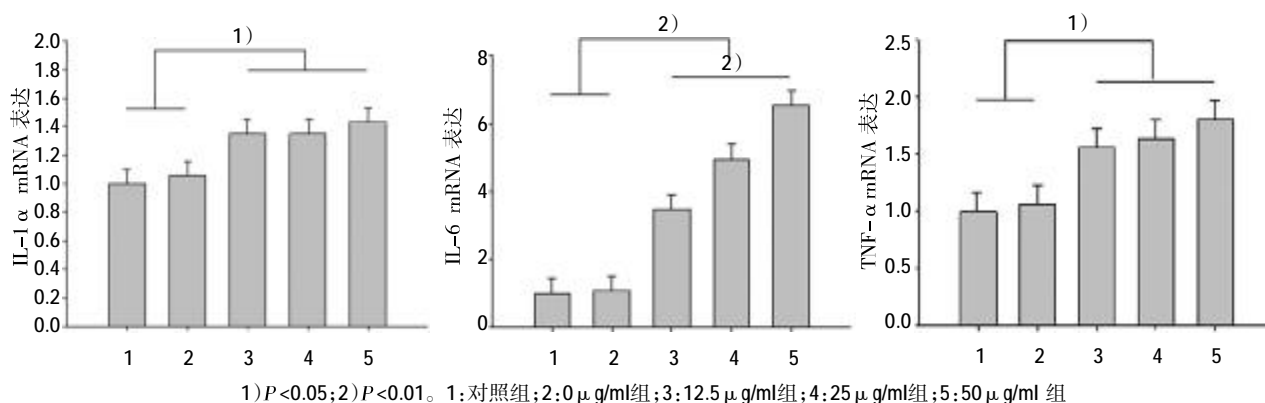


图 1 成骨细胞第 2 代碱性磷酸酶染色 ($\times 400$)



1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$ 。1: 对照组; 2: 0 μ g/ml 组; 3: 12.5 μ g/ml 组; 4: 25 μ g/ml 组; 5: 50 μ g/ml 组

图 2 不同浓度的胆固醇对成骨细胞 IL-1 α 、IL-6 和 TNF- α mRNA 的影响

2.2 胆固醇对成骨细胞 IL-1 α 、IL-6 和 TNF- α 分泌水平的影响

如附表所示, 不同浓度的胆固醇刺激成骨细胞 24 h 后, 酶联免疫吸附法测定细胞培养液上清中分泌 IL-1 α 、IL-6 和 TNF- α 的水平变化。0 μ g/ml 组与对照组比较, IL-1 α 、IL-6 及 TNF- α 均无明显变化; 12.5 μ g/ml、25 μ g/ml 和 50 μ g/ml 组均能显著诱导 IL-1 α 、IL-6 及 TNF- α 的水平。说明胆固醇可以促进 IL-1 α 、IL-6 和 TNF- α 的分泌, 且 IL-6 的分泌与胆固醇浓度呈正相关。

2.3 胆固醇对成骨细胞 Akt 和 NF- κ B 信号通路的影响

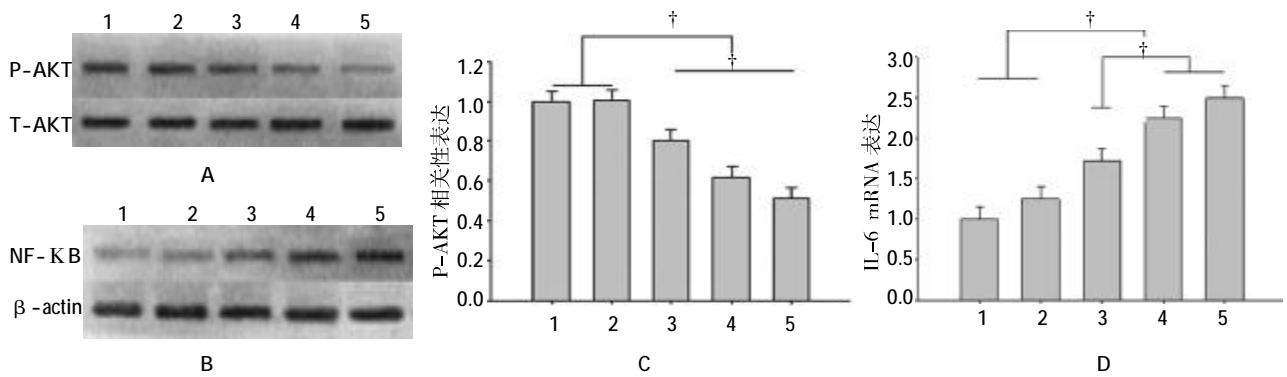
如图 3A 与 3B 所示, 胆固醇刺激成骨细胞后 Western blot 测定不同处理组蛋白变化, 与对照组比较, 12.5 μ g/ml、25 μ g/ml 和 50 μ g/ml 3 组中 NF- κ B

水平均显著增加 ($P < 0.01$), 而 p-Akt 水平显著降低 ($P < 0.01$)。提示: 成骨细胞中胆固醇浓度与 NF- κ B 蛋白表达一定范围内呈正相关 ($P < 0.01$), 胆固醇浓度与成骨细胞 Akt 磷酸化水平一定范围内呈负相关 ($P < 0.01$), 统计结果见图 3C 与 3D。

附表 不同浓度的胆固醇对成骨细胞分泌 IL-1 α 、IL-6 和 TNF- α 的影响 ($n=8$, pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 α	IL-6	TNF- α
对照组	2.21 \pm 0.08	6.28 \pm 0.14	36.05 \pm 0.06
0 μ g/ml 组	2.58 \pm 0.06	6.30 \pm 0.38	37.73 \pm 0.30
12.5 μ g/ml 组	4.25 \pm 0.14 [†]	10.63 \pm 1.28 [†]	51.75 \pm 3.30 [†]
25 μ g/ml 组	3.97 \pm 0.17 [†]	16.08 \pm 1.05 [†]	52.47 \pm 1.48 [†]
50 μ g/ml 组	4.36 \pm 0.18 [†]	18.77 \pm 1.25 [†]	58.69 \pm 3.09 [†]

注: [†] 与对照组比较, $P < 0.01$



† $P < 0.01$ 。1: 对照组; 2: $0 \mu\text{g/ml}$ 组; 3: $12.5 \mu\text{g/ml}$ 组; 4: $25 \mu\text{g/ml}$ 组; 5: $50 \mu\text{g/ml}$ 组; A、B: 胆固醇刺激成骨细胞后不同处理组蛋白变化; C: 不同浓度胆固醇组 P-AKT 相关性表达; D: 不同深度胆固醇组 IL-6 mRNA 表达

图 3 不同浓度胆固醇对成骨细胞 Akt 和 NF- κ B 信号通路的影响

3 讨论

Akt 信号通路及靶基因对骨分化、骨形成和骨重建都有着关键调控作用。血浆网膜素-1 (omentin-1) 和胰岛素可以通过增加 Akt 的磷酸化水平, 促进成骨细胞的增殖。敲除 Akt1/Akt2 的小鼠骨化延迟, 敲除 Akt2 对 BMP2 没有影响, 但可通过对骨特异性转录因子 (Runx2) 基因的调控阻断骨髓基质细胞或间充质干细胞向成骨细胞的分化^[13]。Akt 磷酸化可以抑制糖皮质激素诱导的成骨细胞凋亡。NF- κ B 广泛表达于多种组织细胞中, 其激活后参与许多基因的转录调控, 在免疫、炎症、氧化应激、细胞增殖、细胞凋亡等生理病理过程中发挥重要调控作用。NF- κ B 与骨代谢密切相关, γ 射线可导致 NF- κ B 活化, 促进成骨细胞凋亡。NF- κ B p50 激活后也可刺激成骨细胞和破骨细胞分泌集落刺激因子 1 (colony-stimulating factor 1, CSF-1), 其在骨的重建中有着重要作用。TNF- α 可以刺激成骨细胞 NF- κ B 蛋白与其内源性抑制因子核因子抑制蛋白- κ B (nuclear factor- κ B, I κ B α) 的解离, 短时间可见核周 NF- κ B 蛋白浓度增加, 并迅速入核调控目的基因, 导致成骨细胞凋亡^[14]。NF- κ B 的抑制剂 PMMA 可以有效阻断间质细胞向成熟破骨细胞的分化^[15], 骨保护素 (osteoclastogenesis inhibitory factor, OPG) 与 NF- κ B 配体核因子 KB 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 结合使基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) 表达增高, 阻断破骨细胞的生成、抑制骨的再吸收。本研究结果显示, 胆固醇浓度与 Akt 的磷酸化水平负相关, 与

NF- κ B 的表达正相关, 提示胆固醇可能通过 NF- κ B 与 Akt 信号通路介导成骨细胞分化过程。

PI3K/Akt 是调节 NF- κ B 及下游基因表达的重要信号通路。过表达的胰岛素受体底物 1 (insulin receptor 1, IRS1) 可通过 PI3K/Akt 信号通路抑制 NF- κ B 和其下游 BAX 基因 (Bcl2-associated X protein, BAX) 的表达促进成骨细胞增殖, 且上述作用可以被 PI3K 的抑制剂 LY294002 所逆转^[16]。PI3K/Akt 磷酸化后, 激活 NF- κ B 及其调控下游细胞因子和炎症介质 TNF- α 、IL-1 α 及 IL-6 的释放^[17]。TNF- α 、IL-1 α 、IL-6 等炎症介质的分泌可以促进炎症反应, 不仅对破骨细胞性骨吸收有明显促进作用, 而且还能影响成骨细胞性骨形成。TNF- α 能够抑制胶原合成、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 活性和骨钙素合成, 同时可以通过 NF- κ B 途径增加 IL-6、IL-1 α 和 ICAM1 基因的表达从而增加骨质流失。IL-6 在骨更新中有着重要作用, 成骨细胞分泌的 IL-6 与多种细胞因子共同作用促进骨吸收和骨重建^[18, 19]。本研究观察结果显示, 高胆固醇促进 TNF- α 、IL-1 α 与 IL-6 表达, 而且表达水平与胆固醇浓度正相关, 提示高胆固醇可能通过 Akt/NF- κ B 信号通路促进炎症反应, 从而影响成骨细胞分化过程。

综上所述, 高胆固醇可能通过抑制 Akt 活性激活 NF- κ B 信号通路, 进一步诱导炎症因子的释放, 从而影响成骨细胞分化, 最终导致成骨细胞与破骨细胞的动态失衡而增加骨质疏松发病风险。

参 考 文 献:

[1] TRIMPOU P, ODÉN A, SIMONSSON T, et al. High serum to-

- tal cholesterol is a long-term cause of osteoporotic fracture[J]. *Osteoporosis International*, 2011, 22(5): 1615-1620.
- [2] YOU L, SHENG Z Y, TANG C L, et al. High cholesterol diet increases osteoporosis risk via inhibiting bone formation in rats[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2011, 32(12): 1498-1504.
- [3] MAKOVEY J, CHEN JS, HAYWARD C, et al. Association between serum cholesterol and bone mineral density [J]. *Bone*, 2009, 44(2): 208-213.
- [4] MAJIMA T, SHIMATSU A, KOMATSU Y, et al. Increased bone turnover in patients with hypercholesterolemia[J]. *Endocrine Journal*, 2008, 55(1): 143-151.
- [5] LI M, WANG A, HU L, et al. Climacteric: the Journal of the International Menopause Society[J]. *Climacteric*, 2015, 18(2): 214-218.
- [6] MA Y L, BRYANT H U, ZENG Q, et al. Long-term dosing of arzoxifene lowers cholesterol, reduces bone turnover, and preserves bone quality in ovariectomized rats[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2002, 17(12): 2256-2264.
- [7] DELMAS P D, BJARNASON N H, MITLAK B H, et al. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women[J]. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 1998, 53(5): 293-294.
- [8] SANBE T, TOMOFUJI T, EKUNI D, et al. Oral administration of vitamin C prevents alveolar bone resorption induced by high dietary cholesterol in rats[J]. *Journal of Periodontology*, 2007, 78(11): 2165-2170.
- [9] THYSELL E, SUROWIEC I, HÖRNBERG E, et al. Metabolomic characterization of human prostate cancer bone metastases reveals increased levels of cholesterol[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): Doi: 10.1371/journal.pone.0014175.
- [10] PARHAMI F, TINTUT Y, BEAMER W G, et al. Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2001, 16(1): 182-188.
- [11] JEONG T D, LEE W, CHOI S E, et al. Relationship between serum total cholesterol level and serum biochemical bone turnover markers in healthy pre- and postmenopausal women[J]. *Bio Med Research International*, 2014, 2014: Doi: 10.1155/2014/398397.
- [12] MUNDY G, GARRETT R, HARRIS S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins[J]. *Science*, 1999, 286(5446): 1946-1949.
- [13] MUKHERJEE A, WILSON E M, ROTWEIN P. Selective signaling by Akt2 promotes bone morphogenetic protein 2-mediated osteoblast differentiation[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2010, 30(4): 1018-1027.
- [14] KITAJIMA I, SOEJIMA Y, TAKASAKI I, et al. Ceramide-induced nuclear translocation of NF- κ B is a potential mediator of the apoptotic response to TNF- α in murine clonal osteoblasts[J]. *Bone*, 1996, 19(3): 263-270.
- [15] CLOHISY J C, HIRAYAMA T, FRAZIER E, et al. NF- κ B signaling blockade abolishes implant particle-induced osteoclastogenesis[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2004, 22(1): 13-20.
- [16] ZHANG W, SHEN X, WAN C, et al. Effects of insulin and insulin-like growth factor 1 on osteoblast proliferation and differentiation: differential signalling via Akt and ERK [J]. *Cell Biochemistry and Function*, 2012, 30(4): 297-302.
- [17] EHRHARDT C, LUDWIG S. A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway[J]. *Cellular Microbiology*, 2009, 11(6): 863-871.
- [18] GIULIANI N, PEDRAZZONI M, PASSERI G, et al. Bisphosphonates inhibit IL-6 production by human osteoblast-like cells[J]. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 1998, 27(1): 38-41.
- [19] YOKOTA K, SATO K, MIYAZAKI T, et al. Combination of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 induces mouse osteoclast-like cells with bone resorption activity both in vitro and in vivo[J]. *Arthritis & Rheumatology*, 2014, 66(1): 121-129.

(张蕾 编辑)