

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.12.007

尿酸对类成骨细胞(MG-63)增殖的影响及其机制研究*

王淑芳^{1,2} 杨乃龙^{1Δ} 孙玉英² 谢婷婷¹

(1 青岛大学附属医院内分泌科 山东 青岛 266000; 2 曹县人民医院 山东 菏泽 274400)

摘要 目的:探讨尿酸对类成骨细胞(MG-63)增殖的影响及其可能机制。**方法:**将生长状态良好的类成骨细胞(MG-63)分为四组,分别为对照组(加入成骨培养液的完全培养基)和实验组(分别加入成骨培养液及含 0.2、0.4、0.8mmol/L 尿酸的完全培养基),诱导第 14 天,在倒置显微镜下观察细胞形态变化,分别在第 7 天和第 14 天检测类成骨细胞(MG-63)碱性磷酸酶活性,CKK-8 法检测细胞增殖情况以及 RT-PCR 法检测 TGF-β1 mRNA 的表达。**结果:**尿酸干预类成骨细胞(MG-63)后,细胞数目随着尿酸浓度的升高逐渐增加,以 0.8 mmol/L 最明显。类成骨细胞(MG-63)碱性磷酸酶活性与增殖能力均增高;细胞 TGF-β1 mRNA 表达升高,呈现浓度、时间依赖性;以上指标于实验组与对照组间以及各实验组组间比较,差异均有统计学意义(P<0.05)。**结论:**尿酸可刺激类成骨细胞(MG-63)增殖,可能与促进 TGF-β1 转录有关。

关键词:尿酸;类成骨细胞;增殖;转化生长因子-β1(TGF-β1)

中图分类号:R-33; Q593.6; R68; R589 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)12-2227-05

Effect and Mechanism of UA on the Proliferation of MG-63*

WANG Shu-fang^{1,2}, YANG Nai-long^{1Δ}, SUN Yu-ying², XIE Ting-ting¹

(1 Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266000, China;

2 Caoxian People's Hospital, Heze, Shandong, 274400, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect and mechanism of uric acid (UA) on the proliferation of osteoblast-like cells (MG-63) in vitro. **Methods:** The osteoblast-like cells (MG - 63) were divided into four groups: control group treated by osteoblast inducing media in complete medium and treatment groups by treated by osteoblast inducing media and different concentrations of uric acid (0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.8 mmol/L) in complete medium. After fourteen days of induction, the cell morphology was observed under an inverted microscope. After seven and fourteen days of induction, the cell proliferation was identified by alkaline phosphatase activity and cell counting kit-8 (CKK-8) method. The expression of transforming growth factor-β1 (TGF - β1) mRNA was detected by reverse transcription PCR (RT-PCR). **Results:** Cells was increased more with the group of higher concentrations of uric acid, and the cells in 0.8mmol/L uric acid formed the most numbers among all the groups. Cell proliferated capacity and the alkaline phosphatase of each group with different concentrations of uric acid interfering the MG - 63 were increased, the expression of TGF-β1 mRNA was evaluated with the increase of UA concentrations and with intervention time. The comparison between each experimental group and control group or the comparison between each experimental group has statistic significance (p< 0.05). **Conclusions:** The uric acid could promote the proliferation of osteoblast-like cells (MG - 63), which might be associated to promote the transcription of TGF-beta1.

Key Words: Uric acid; Osteoblast-like cells; Proliferation; Transforming growth factor-β1

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q593.6; R68; R589 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)12-2227-05

前言

骨质疏松(Osteoporosis, OP)是一种以骨量降低、骨组织显微结构退化为特点的疾病,可导致成人骨脆性增加、骨折风险增高。在 OP 患者的骨骼代谢中,主要由于在骨重建过程中骨吸收与骨形成之间病理性的不平衡引起骨量丢失。成骨细胞增殖和正常功能减弱,分泌骨钙素的能力下降,并且由于骨钙素分泌减少,其对 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 的反应明显减弱^[1],这些均是导致骨质疏松的重要原因。在众多骨代谢调节作用因素

中,转化生长因子 β1(transforming growth factor, TGF-β1)越来越受到人们的关注。TGF-β1 属于 TGF-β 超家族,既可调节细胞生长又可调节细胞分化,可促进成骨细胞 DNA、胶原蛋白合成,进而促进其分裂增殖。既往体外实验证实 TGF-β1 促进成骨细胞分化的标志物 I 型胶原、骨粘连蛋白及碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)表达,并且可与 1,25(OH)₂ 维生素 D₃ 协同作用提高细胞的 ALP 的表达^[2]。

尿酸是一种弱有机酸,pH 为 5.75, 低于人体液生理 pH7.35~7.45,多以尿酸盐的形式存在体内。人体嘌呤代谢生成的尿

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30871192);青岛市科技基金项目(08-2-1-5-nsh-6)

作者简介:王淑芳(1971-),女,硕士研究生,主要研究方向:内分泌疾病,电话:15506601821, E-mail: hzcwxf@163.com

Δ 通讯作者:杨乃龙, E-mail: nailongy@163.com

(投稿日期:2016-08-13 接受日期:2016-09-10)

酸总量远高于谷胱甘肽、维生素 C、维生素 E,在生理酸碱度范围内能有效发挥调节作用。在骨质疏松症的发生发展中,尿酸可能是一个保护性的因素。我们前期的研究显示尿酸可以通过促进 Cbfa 1/Runx2^[3]、BMP2^[4]、Wnt3α/β-catenin mRNA^[5]等信号分子及其参与的信号通路,抑制 11β-HSD1^[6]的表达促进骨髓间充质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)向成骨细胞分化,抑制 BMSCs 成脂分化。本实验应用不同浓度尿酸干预类成骨细胞(MG-63)增殖分化,观察尿酸对类成骨细胞(MG-63)增殖和 TGF-β1 mRNA 表达的影响,以期探讨骨质疏松症发病机制提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 设计

细胞学体外实验研究。

1.2 时间及地点

实验于 2014 年 7 月至 2015 年 7 月在青岛大学附属医院黄岛分院科教楼痛风实验室完成。

1.3 材料

类成骨细胞(MG-63)来自湘雅医院赠送;高糖 -DMEM、胎牛血清、胰蛋白酶、双抗购自 Hyclone 公司;地塞米松、L2- 磷酸抗坏血酸、α- 甘油磷酸购自 Sigma 公司;ALP 染色试剂盒及 BCA 法蛋白定量试剂盒购自南京建成生物工程研究所有限公司;TRITON-X100 购自 Solarbio 公司;TRIZOL 购自 Gibco 公司;反转录试剂盒及 RT-PCR 试剂盒购自 Tiangen 公司;引物合成由上海生物工程技术服务公司完成。

1.4 实验方法

本研究中细胞实验均设置 1 个对照组与 3 个实验组,前期细胞贴壁采用完全培养基(含体积分数 10%的胎牛血清、1%的双抗、89%的高糖 DMEM),后期对照组和实验组更换培养液后分别加入含 0、0.2、0.4、0.8 mmol/L 尿酸浓度的成骨诱导培养液^[7] (含体积分数为 10%胎牛血清、1× 10⁻⁸ mol/L 地塞米松、10 mmol/L α- 甘油磷酸钠、50g/L 抗坏血酸、1%的双抗的高糖 DMEM 培养液)培养。

1.4.1 类成骨细胞(MG-63)复苏及培养,观察细胞的形态学变化 类成骨细胞(MD-63)复苏培养后,选取处于对数生长期第 3 代类成骨细胞(MG-63),消化制备 2× 10⁵/L 的细胞悬液并接种到 6 孔无菌细胞培养板内。对照组与实验组均设置 3 个复孔,培养 2 d 后,更换培养基,分别加入 0、0.2、0.4、0.8 mmol/L 尿酸浓度的成骨诱导培养液,置 37℃、5%CO₂ 培养箱诱导培养,每 3 d 换液 1 次,连续诱导 14 d,观察细胞的形态学变化。

1.4.2 不同浓度尿酸干预的类成骨细胞 (MG-63)ALP 活性检测 取对数生长期类成骨细胞 (MG-63),制备细胞浓度 2× 10⁵/L 的细胞悬液并接种到 6 孔无菌细胞培养板内。对照组与实验组均设置 4 个复孔,于培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后更换培养基,分别加入 0、0.2、0.4、0.8 mmol/L 尿酸浓度的成骨诱导培养液,置 37℃、5%CO₂ 温箱内诱导培养 7 d, PBS 冲洗两遍,加入 1% Triton-X100 200 μL/ 孔,裂解细胞 40 min,反复吹打后,收集于 1.5 mL EP 管中,按照 ALP 活性检测试剂盒说明书进行成骨细胞 ALP 活性检测,分别于 562 nm 波长处和 520

nm 波长处检测各孔 OD 值,按照公式分别计算各组成骨细胞中 ALP 活力。细胞 ALP 活力 = (测定吸光度值 - 空白吸光度值)/(标准吸光度值 - 空白吸光度值)× 酚标准品浓度 / 待测样本浓度。

1.4.3 CCK-8 法检测类成骨细胞(MG-63)增殖能力 取对数生长期 MG-63 细胞,制备细胞浓度 1× 10⁴/L 的细胞悬液,接种到 96 孔无菌细胞培养板内,对照组与实验组均设置 6 个复孔,每孔加入 100 μL 细胞悬液,于培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后更换培养液,分别加入 0、0.2、0.4、0.8 mmol/L 尿酸浓度的成骨诱导培养液,按时间梯度于第 3、5、7、14 天顺次采集细胞,于待检测培养孔加入 CCK-8 10 μL/ 孔,37℃继续孵育 4 h,测定波长 450 nm 处各孔 OD 值。

1.4.4 RT-PCR 法检测类成骨细胞(MG-63)TGF-β1 mRNA 的表达 取对数生长期 MG-63 细胞,制备细胞浓度 2× 10⁵/L 的细胞悬液,接种到 6 孔无菌细胞培养板内,对照组与实验组均设置 3 个复孔,于培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后更换培养液,对照组与实验组分别加入完全培养基、0、0.2、0.4、0.8 mmol/L 尿酸浓度的成骨诱导培养液,继续放入培养箱内培养。各组分别于诱导的第 7 天、第 14 天收集细胞,进行 RT-PCR 检测 TGF-β1 mRNA 的表达。

总 RNA 的提取:6 孔板细胞用 PBS 冲洗 2 遍,加入 1 mL Trizol/ 孔,充分吹打,将其移到 1.5 mL EP 管,静置 5 min,加入 0.2 mL 氯仿,全速振荡 15 s,静置 3 min;4℃、12000 r/min,离心 15 min,将上层水相转移到另外一新 1.5 mL EP 管中;加入 0.5 mL 异丙醇,充分混匀,静置 5 min;4℃、7500 r/min,离心 10 min,弃上清;加入 1 mL 75%乙醇洗涤沉淀,4℃、7500 r/min,离心 10 min,弃上清;于超净工作台上鼓风干燥 10 min 后,加入 20 μL 无 RNase 水,并在 260 nm/280 nm 波长下测定浓度,-80℃冻存备用。

反转录合成 cDNA:(1)配制去除 gDNA 混合液,按照 Fast Quant RT Kit (with gDNase) 说明书,每个反应体系依次加入 RNA 2 μg、5× gDNA Buffer 2 μL、无 RNase 水补足至 10 μL,瞬时离心,置于 42℃孵育 3 min 去除 gDNA 后,混合液置于冰上待用;(2)配制反转录反应液,每个反应体系依次加入 RT Enzyme Mix 1 μL、FQ-RT Primer Mix 2 μL、10× Fast RT Buffer 2 μL,加 5 μL 无 RNase 水补足至 10 μL,将反转录体系的 Mix 加到去除 gDNA 的混合液中,充分混匀,42℃、15 min,95℃、3 min 反转录合成 cDNA。

PCR 所用引物序列:TGF-β1: 上游引物 5'-TGCGTAAAT-GTGAAGCTCTGTC-3', 下游引物 5'-ACTCTTAGGCTCAAG-CAATC-3'; PCR 扩增的反应体系为 278 bp。内参照 GAPDH: 上游引物 5'-GATAGCATTGCTTTCGTGT-3', 下游引物 5'-TTCAACTGGTCTCAAGTCAG-3'。PCR 扩增的反应体系为 249 bp。PCR 反应体系为 25 μL,包括:2× SuperReal PreMix Plus 12.5 μL,正向引物 0.75 μL,反向引物 0.75 μL,cDNA 模板 11 μL;扩增条件:95℃、15 min 预变性,95℃、10 s 变性,52℃、30 s 退火,72℃、32 s 延伸,40 个循环。

1.5 主要观察指标

类成骨细胞(MG-63)增殖过程中 ALP 活性、增殖情况以及

TGF- β 1 mRNA 的表达。

1.6 统计学分析

本研究采用 SPSS19.0 IBM 软件统计分析; 正态分布计量资料以 (s 为标准差) 表示, 多组间比较选用 one-way ANOVA 检验; 多组之间两两比较采用方差分析下 LSD-t 检验方法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞形态的比较

类成骨细胞(MG-63)贴壁法以软骨诱导液培养 3 d 后首次换液, 在倒置显微镜下观察, 见大量贴壁的细胞团簇, 细胞开始生长伸出伪足, 形态呈纺锤形、梭形。第 7 天左右可见对照组与各尿酸浓度实验组 (0、0.2、0.4、0.8 mmol/L) MG-63 细胞已全部贴壁, 呈典型集落样生长, 细胞迅速增殖, 呈长梭形, 并相互融合成单层细胞, 见图 1。

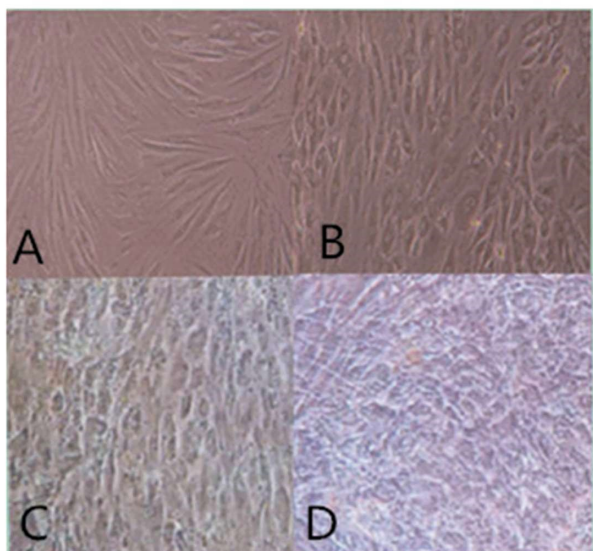


图 1 各组类成骨细胞(MG-63)形态

注: A: 0 mmol/L; B: 0.2 mmol/L 尿酸组; C: 0.4 mmol/L 尿酸组; D: 0.8 mmol/L 尿酸组。不同浓度尿酸培养 7 天, 细胞形态学变化, 随着尿酸浓度增加, 细胞数目增加($\times 100$)。

Fig.1 Morphology of MG-63 cells

Note: A: 0mmol/L UA group; B: 0.2mmol/L UA group; C: 0.4mmol/L group UA group; D: 0.8mmol/L UA group. MG-63 cells were increased with the increase of different concentration of uric acid after 7 days.

2.2 不同浓度尿酸对类成骨细胞(MG-63) ALP 活性的影响

类成骨细胞(MG-63)培养 7 d 后, 尿酸组 ALP 活性明显高于对照组, 且 ALP 活性随培养液尿酸浓度增加而增高, 以 0.8 mmol/L 尿酸组活性最高($P < 0.05$), 见图 2。

2.3 不同浓度尿酸对类成骨细胞(MG-63)增殖的影响

CCK8 检测结果显示: 与对照组比较, 各尿酸实验组细胞 OD 值明显高于对照组, 且随着尿酸浓度的增加, OD 值逐渐增高, 尿酸组组间比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1。

2.4 不同浓度尿酸对类成骨细胞(MG-63) TGF- β 1 mRNA 表达的影响

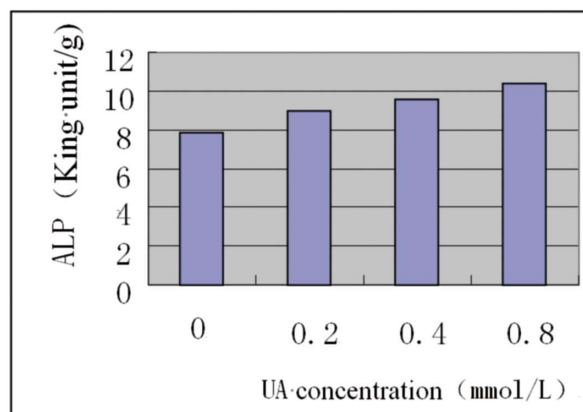


图 2 尿酸对类成骨细胞(MG-63) ALP 活性的影响

Fig. 2 Effect of uric acid on the alkaline phosphatase activity in MG-63 cells

注: MG-63 细胞培养 7 d 后碱性磷酸酶活性随着尿酸浓度增高而增加

Note: Alkaline phosphatase activity was increased with increasing concentration of UA.

Real Time-PCR 结果显示: 对照组与实验组 (0、0.2、0.4、0.8 mmol/L 尿酸浓度) 第 7 天 TGF- β 1/GAPDH 结果分别为 0.51 ± 0.059 、 0.68 ± 0.042 、 0.80 ± 0.0057 、 0.87 ± 0.0026 ; 第 14 天 TGF- β 1/GAPDH 结果分别为 0.77 ± 0.0567 、 0.86 ± 0.0040 、 0.90 ± 0.0047 、 0.97 ± 0.0103 。尿酸可上调 TGF- β 1 mRNA 的转录, 且随着尿酸浓度升高, TGF- β 1 mRNA 表达增加。尿酸实验组与对照组比较及尿酸实验组组间比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2, 图 3。

3 讨论

成熟骨组织主要依赖于骨重建进行着连续的破骨与成骨循环, 对其进行有序性偶联调节是维持正常骨量和骨生理功能的基础。成骨细胞在骨的形成、生长及发育过程中发挥重要作用, 众多信号分子及其参与调控的信号通路联合作用, 共同决定成骨细胞的分化时机、分化方向。其中, 各种激素、细胞因子、生长因子在互相关联的同时, 也互相制约, 共同控制骨代谢功能和破骨/成骨活性的平衡, 维持正常骨量和骨的生物学质量。详细、完善地认识成骨细胞分化过程中的调节信号和信号通路过程, 是进一步研究成骨细胞分化的前提, 同时也是未来实现骨组织工程化培养的先决条件。

尿酸是人体嘌呤代谢的内源性终产物, 具备双重作用。一方面, 正常浓度范围内的尿酸是人体一种重要的抗氧化剂, 可清除血液中的氧自由基, 避免细胞受到氧化损伤, 降低 DNA 损伤; 另一方面, 高浓度的尿酸会引起代谢综合征^[8,9]、胰岛素抵抗及糖尿病^[10,11]、心脑血管事件^[12,13]等, 对人体产生危害。近期研究表明, 中等浓度以上 (不包括中等) 的尿酸能够升高骨密度值, 降低骨质疏松发生率^[14,15]; 而低浓度尿酸可以降低骨密度值, 提高骨质疏松的发生率^[16]。人体尿酸的正常血浆浓度男性为 $0.15 \sim 0.38$ mmol/L, 女性为 $0.1 \sim 0.36$ mmol/L。高尿酸血症的诊断标准: 检测血浆尿酸浓度, 男性或绝经后女性 > 0.42 mmol/L, 绝经前女性 > 0.38 mmol/L。因此, 本实验采用的尿酸浓度为 0.2、0.4、0.8 mmol/L。我们前期试验已经证实尿酸可以促进 BMSCs 向成骨细胞分化, 抑制 BMSCs 向成脂细胞分化^[5,8], Makovey^[17]

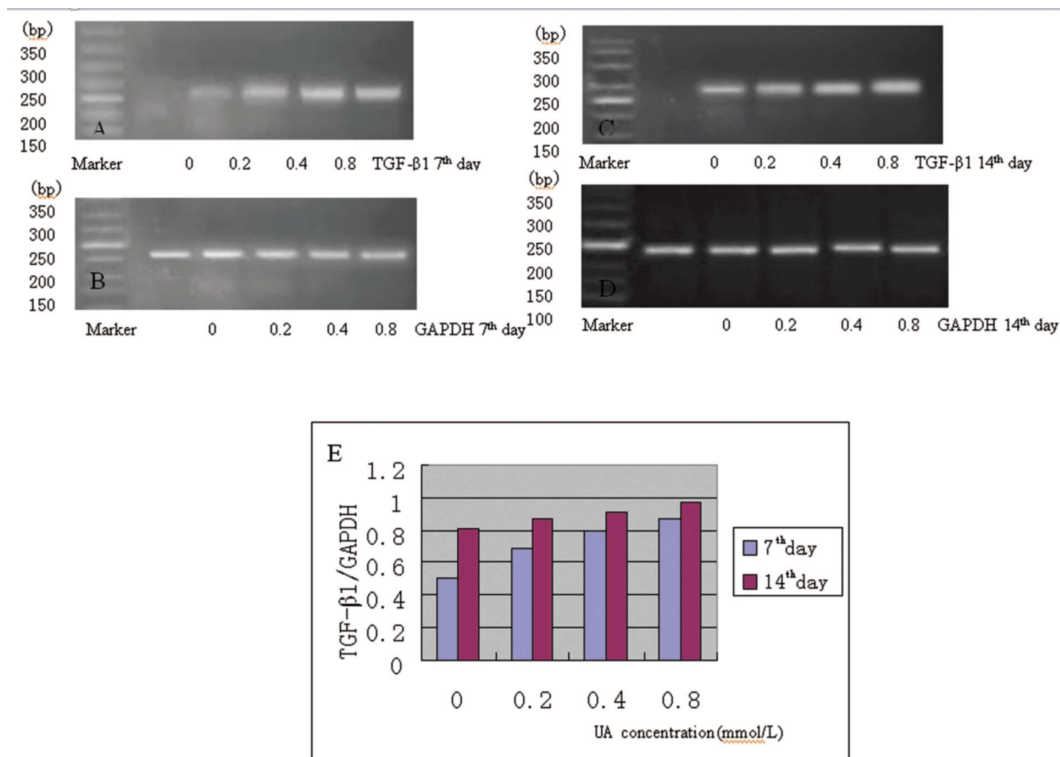


图4 各组 MG-63 细胞在第 7 天和第 14 天 TGF-β1 mRNA 的表达

注: A:第 7 天 TGF-β1 mRNA 的表达;B:第 7 天 GAPDH 的表达;C:第 14 天 TGF-β1 mRNA 的表达;D:第 14 天 GAPDH 的表达;E: TGF-β1/GAPDH 灰度值比

Fig.4 TGF-β1 mRNA expression of MG-63 cells induced for 7 days and 14 days

Note:A: TGF-β1 mRNA expression induced for 7 days; B: TGF-β1 mRNA expression induced for 14 days; C:GAPDH expression for 7 days; D: GAPDH expression for 14days; E: Ratio of TGF-β1 compare to GAPDH at different of UA concentrations

表 1 不同浓度尿酸对 MG-63 细胞增殖的影响(CCK8, A450)

Table 1 Effects of different concentrations of UA on the proliferation of MG-63 cells (CCK8, A450)

Groups	3 day	5 day	7 day	14 day
0	0.57± 0.0359	0.62± 0.0388 ^d	0.74± 0.0288 ^{de}	0.92± 0.0208 ^{def}
0.2	0.57± 0.0158	0.69± 0.0178 ^{ad}	1.06± 0.1063 ^{ade}	1.74± 0.0834 ^{adef}
0.4	0.67± 0.0166 ^a	0.90± 0.0423 ^{abd}	1.29± 0.1668 ^{abde}	2.76± 0.1245 ^{abdef}
0.8	0.88± 0.0333 ^{abc}	1.05± 0.0619 ^{abcd}	1.40± 0.8354 ^{abcde}	3.70± 0.1620 ^{abcdef}

注:不同浓度尿酸组与对照组比较: ^aP<0.05, a 与 0 mmol/L 组比较; ^bP<0.05, b 与 0.2 mmol/L 组比较; ^cP<0.05, c 与 0.4 mmol/L 组比较; 组间比较: ^dP<0.05, d 与第三天组比较; ^eP<0.05, e 与第五天比较; ^fP<0.05, f 与第七天比较。

Note: compared with the same period: ^aP<0.05, vs 0 mmol/L group; ^bP<0.05, vs 0.2 mmol/L UA group; ^cP<0.05, vs 0.4 mmol/L UA group; compared with the same concentrations: ^dP<0.05, vs the 3rd day; ^eP<0.05, vs the 5th day; ^fP<0.05, vs the 7th day.

表 2 不同浓度尿酸处理第 7 天和第 14 天时 TGF-β1/GAPDH 比值(RT-PCR)

Table 2 Ratio of TGF-β1 to GAPDH in MG-63 cells treated by different concentrations of UA on the 7th and 14th day(RT-PCR)

Groups	0	0.2	0.4	0.8
7th day	0.51± 0.0590	0.68± 0.0420 ^a	0.80± 0.0057 ^{ab}	0.87± 0.0026 ^{abc}
14th day	0.77± 0.0567	0.86± 0.0040 ^{ad}	0.90± 0.0047 ^{abc}	0.97± 0.0103 ^{abcf}

注:不同浓度尿酸组与对照组比较: ^aP<0.05, a 与 0 mmol/L 组比较; ^bP<0.05, b 与 0.2 mM 组比较; ^cP<0.05, c 与 0.4 mM 组比较; 组间比较: ^dP<0.05, d 与第 7 天 0.2 mM 组比较; ^eP<0.05, e 与第 7 天 0.4 mM 比较; ^fP<0.05, f 与第 7 天 0.8 mM 比较。(1 Mm=1 mmol/L)

Note: compared with the same period: ^aP<0.05, vs 0Mm UA; ^bP<0.05, vs 0.2 mM UA; ^cP<0.05, vs 0.4 mM UA; compared with the different groups of 7th day: ^dP<0.05, vs the 0.2 mM of 7th day; ^eP<0.05, vs the 0.4 mM of 7th day; ^fP<0.05, vs the 0.8 mM of 7th day.(1 Mm=1 mmol/L)

等进行的纵向调查表明尿酸对围绝经期和绝经期骨质疏松是重要的保护因素。ALP 是成骨细胞分泌的一种酶蛋白,在早期分化、成熟时呈现高表达状态,具有标志分化的价值。本研究分别在诱导培养后第 7 天采集 MG-63 细胞,分别检测实验组和对照组 ALP 活性,发现 ALP 活性随尿酸浓度增加而增强,并且尿酸组 ALP 活性均明显高于对照组,比较有显著差异。同时,CCK-8 检测结果与之一致,随着尿酸浓度升高,类成骨细胞(MG-63)分化增殖增强,其中 0.8mol/L 尿酸作用最明显,同样呈现尿酸浓度依赖性。细胞形态学观察与 ALP 活性和 CCK-8 法细胞增殖能力测定的结果相一致。以上结果再次证实了尿酸可以促进成骨细胞的增殖,且呈浓度依赖性。

TGF- β 超家族是一个分泌型多肽信号超家族,其成员 TGF- β 1 基因定位于 19q13.1 染色体,cDNA 全长 2745 bp,包含 7 个外显子,6 个内含子。TGF- β 1 在骨基质中含量最高,约占 TGF- β 总量的 80%~90%^[18]。近年发现 TGF- β 1 在大鼠骨 BMSCs 的成骨分化过程中发挥重要作用,在成骨过程中刺激成骨细胞增殖,促进胶原合成,从而调节细胞分化、促进细胞增殖与细胞外基质合成,并能调节机体免疫功能^[19]。体外实验表明 TGF- β 1 可以增加骨连素(Ostocnectin)、骨桥蛋白(Ostoc-pontin)、I 型胶原的合成,同时可以抑制破骨细胞生成、降低成熟破骨细胞的活性,从而进一步抑制骨吸收。此外,TGF- β 1 可以降低成脂标志物表达,如 Pparg2、And 的表达^[20]。还有研究表明 TGF- β 1 不仅可以抑制 BMSCs 向脂肪细胞分化,也可以抑制糖皮质激素和成纤维细胞生长因子所诱导的 BMSCs 向脂肪细胞分化^[21]。本研究采用 RT-PCR 检测不同尿酸浓度培养 MG-63 细胞的 TGF- β 1 mRNA,结果显示不同尿酸浓度(0、0.2、0.4、0.8 mmol/L)第 7 天和第 14 天 TGF- β 1/GAPDH 结果分别为 0.51 ± 0.059 、 0.68 ± 0.042 、 0.80 ± 0.0057 、 0.87 ± 0.0026 、 0.77 ± 0.0567 、 0.86 ± 0.0040 、 0.90 ± 0.0047 、 0.97 ± 0.0103 。由此可见,尿酸可上调 TGF- β 1 mRNA 表达,且随着尿酸浓度的增加 TGF- β 1 mRNA 表达逐渐增加,呈现浓度和时间依赖性。

综上所述,尿酸可促进成骨细胞增殖分化,TGF- β 1/Smad 信号通路的激活可能是尿酸促进成骨细胞分化增殖的重要机制之一。成骨细胞的增殖有很多激素及细胞因子参与,这些因素之间相互作用,相互影响,本研究只是针对单一细胞因子,其他信号分子间的相互促进或者抑制作用尚需要进一步探索。

参考文献(References)

- [1] Maruotti N, Corrado A, Grano M, et al. Normal and osteoporotic human osteoblast behaviour after 1,25-dihydroxy vitamin D stimulation[J]. Rheumatol Int, 2009, 29(3): 667-672
- [2] Ingram RT, Bonde SIL, Riggs BL, et al. Effects of transforming growth factor beta (TGF beta) and 1, 25 dihydroxyvitamin D3 on the function, cytochemistry and morphology of normal human osteoblast like cell[J]. Differentmion, 1994, 55(2): 153-163
- [3] 张山山, 杨乃龙, 徐丽丽, 等. 尿酸对人骨髓间充质干细胞成骨分化中 Cbfa 1/Runx2 表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(4): 363-366
Zhang Shan-shan, Yang Nai-long, Xu Li-li, et al. Effect of uric acid on the expression of Cbfa 1 / Runx2 during the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Chin J Osteoporos, 2013, 19(4): 363-366
- [4] 谢婷婷, 杨乃龙, 徐丽丽, 等. 尿酸影响人骨髓间充质干细胞成骨分化过程中 BMP-2 的表达 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(12): 2251-2256
Xie Ting-ting, Yang nai-long, Xu Li-li, et al. Effect of UA on the Expression of BMP-2 during the Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15(12): 2251-2256
- [5] 王潇丽, 徐丽丽, 杨乃龙. 尿酸对人骨髓间充质干细胞成骨分化过程中 Wnt 信号通路的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(28): 4472-4477
Wang Xiao-li, Xu Li-li, Yang Nai-long. Uric acid effect on Wnt signaling pathways during osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2015, 19(28): 4472-4477
- [6] 李百举, 杨乃龙, 张山山, 等. 人骨髓间充质干细胞体外诱导过程中 11 β -HSD1 的表达[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2013, 6(1): 56-59
Li Bai-ju, Yang Nai-long, Zhang Shan-shan, et al. Uric acid down-regulates expression of 11 β -HSD1 in the course of hBMSCs induction into osteoblast in vitro [J]. Chin J Osteoporosis & Bone Minerres, 2013, 6(1): 56-59
- [7] 李茂月, 孙丽荣. 木糖醇对大鼠肾小球系膜细胞损伤的实验研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2009
Li Mao-yue, Sun Li-rong. Experimental study on the injury of xvlitol to mesangial cells of rats [D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2009
- [8] Park KK, Kim SJ. Association between bone mineral density and metabolic in ostenopausal Korean women [J]. Gynecol Obsetet Invest, 2010, 69(3): 145-152
- [9] Li C, Haieh MC, chang SJ, Metabolic syndrome, diabetes, and hypemicemia[J]. Curr Opin Rheumatol, 2013, 25(2): 210-216
- [10] Wu HH, Liu NJ, Yang Z, et al. Association and interaction analysis of PPARGC1A and serum UA on type 2 diabetes mellitus in Chinese Han population [J]. Diabetology & metabolic syndrome, 2014, 6(1): 107-109
- [11] Katsiki N, Papanas N, Fonseca VA, et al. Uric acid and diabetes; is there a link?[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(27): 4930-4937
- [12] Kivity S, Kopel E, Maor E, et al. Association of serum uric acid and cardiovascular disease in healthy adults [J]. Am J Cardiol, 2013, 111 (8): 1146-1151
- [13] Kanbay M, Segal M, Msar B, et al. The role of uric acid in the pathogenesis of human cardiovascular disease[J]. Heart, 2013, 99(11): 759-766
- [14] Nabipour I, Sambrook PN, Blyth FM, et al. Serum uric acid is associated with bone health in older men: a cross-sectional population-based Study [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2011, 26(5): 955-964
- [15] Sugiura M, Nakamura M, Ogawa K, et al. Bone mineral density in post-menopausal female subjects is associated with serum antioxidant carotenoids[J]. Osteoporos Int, 2008, 19(2): 211-219
- [16] Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, et al. Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88 (4): 1523-1527

参考文献(References)

- [1] 韩帮锋, 吴平凡, 潘剑, 等. 鼠双微粒体 2 蛋白, P53 在口腔白斑和鳞癌中的表达及其相关性的研究 [J]. 华西口腔医学杂志, 2011, 29(1): 79-82
- Han Bang-feng, Wu Ping-fan, Pan Jian, et al. Expression and its relationship of murine double minute 2 and P53 protein in oral leukoplakia and squamous cell carcinoma [J]. West China Journal of Stomatology, 2011, 29(1): 79-82
- [2] Stein U, Dahlmann M, Walther W. MACC1-more than metastasis? Facts and predictions minute 2 and P53 protein in oral leukoplakia and squamous cell carcinoma [J]. West China about a novel gene[J]. Journal of molecular medicine, 2010, 88(1): 11-18
- [3] 赵今, 郭斌, 马三成, 等. p53 和 Ki-67 在老年人口腔癌前病变的表达及临床意义[J]. 四川大学学报(医学版), 2005, 36(5): 689-691
- Zhao Jin, Guo Bin, Ma San-cheng, et al. Expression of p53 and Ki-67 Genes in Epithelial Dysplasia from Old Oral Mucosa and Clinical Significance [J]. Journal of Sichuan University (Medical Science Edition), 2005, 36(5): 689-691
- [4] Kokoszyńska K, Kryński J, Rychlewski L, et al. Unexpected domain composition of MACC1 links MET signaling and apoptosis [J]. Acta Biochim Pol, 2009, 56(2): 317-323
- [5] Stein U, Walther W, Arlt F, et al. MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis[J]. Nature medicine, 2009, 15(1): 59-67
- [6] 江俊伟, 葛林虎. MACC1、c-met 蛋白与非小细胞肺癌的分化、浸润、转移及生存期的关系分析 [J]. 实用医学杂志, 2014, 25(12): 1936-1938
- Jiang Jun-wei, Ge Lin-hu. Relationship between MACC1, c-Met protein and non small cell lung cancer, the relationship between the differentiation, invasion, metastasis and survival [J]. The Journal of Practical Medicine, 2014, 25(12): 1936-1938
- [7] Shirahata A, Sakata M, Kitamura Y, et al. MACC 1 as a marker for peritoneal-disseminated gastric carcinoma [J]. Anticancer research, 2010, 30(9): 3441-3444
- [8] Qiu J, Huang P, Liu Q, et al. Identification of MACC1 as a novel prognostic marker in hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Translational Medicine, 2011, 9: 166
- [9] 陈仲伟, 徐冬贵, 朱李军, 等. HGF/C-Met 在舌部鳞状细胞癌的表达及其临床意义[J]. 口腔医学研究, 2013, 29(1): 76-81
- Chen Zhong-wei, Xu Dong-gui, Zhu Li-jun, et al. Expression of Hepatocyte Growth Factor and c-Met in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue [J]. Journal of Oral Science Research, 2013, 29(1): 76-81
- [10] Cecchi F, Rabe DC, Bottaro DP. Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy[J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16(6): 553-572
- [11] 苏会玲, 刘凤玲. HGF/c-MET 通路在癌症中的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2013, 28(1): 98-100
- Su Hui-ling, Liu Feng-ling. The research progress of HGF/c-MET pathway in cancer [J]. The Practical Journal of Cancer, 2013, 28(1): 98-100
- [12] 尚超, 张辉, 宋永胜. MACC1 基因与肾癌转移的相关性及其对细胞侵袭能力的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(4): 637-639
- Shang Chao, Zhang Hui, Song Yong-sheng. The relationship between MACC1 gene and renal carcinoma and its influence to invasiveness of Caki-1 cells[J]. Journal Of Modern Oncology, 2011, 19(4): 637-639
- [13] Juneja M, Ilm K, Schlag PM, et al. Promoter identification and transcriptional regulation of the metastasis gene MACC1 in colorectal cancer[J]. Mol Oncol, 2013, 7(5): 929-943
- [14] Stein U, Smith J, Walther W, et al. MACC1 controls Met: what a difference an Sp1 site makes[J]. Cell Cycle, 2009, 8(15): 2467-2469
- [15] Sheng XJ, Li Z, Sun M, et al. MACC1 induces metastasis in ovarian carcinoma by upregulating hepatocyte growth factor receptor c-MET [J]. Oncol Lett, 2014, 8(2): 891
- [16] Hu Wen Sheng, Fu Xi. Expression and prognostic significance of MACC1 and C-met in non-small cell lung cancer[J]. J Lung Cancer in China, 2012, 15(7): 399-403
- [17] Zhang R, Shi H, Chen Z, et al. Effects of metastasis-associated in colon cancer 1 inhibition by small hairpin RNA on ovarian carcinoma OVCAR-3 cells [J]. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, 2011, 30: 83
- [18] 吴健, 张昶, 朱亚宁. MACC1 在膀胱癌中的表达及临床意义[J]. 江苏医药, 2011, 37(1): 101-102
- Wu Jian, Zhang Chang, Zhu Ya-ning. The expression and clinical significance of MACC1 in bladder cancer [J]. Jiangsu Medical Journal, 2011, 37(1): 101-102
- [19] Yang T, Kong B, Kuang YQ, et al. Overexpression of MACC1 protein and its clinical implications in patients with glioma [J]. Tumour Biol, 2014, 35(1): 815-819
- [20] 尚超, 张辉, 宋永胜. 肾癌细胞增殖过程 MACC1 和 c-MET 调控机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(14): 1065-1067
- Shang Chao, Zhang hui, Song Yong-sheng. Regulation between MACC1 and c-MET in proliferative process of renal carcinoma[J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2011, 18(14): 1065-1067

(上接第 2231 页)

- [17] Makovey J, Macara M, Chen JS, et al. Serum UA plays a protective role for bone loss in peri- and postmenopausal women: a longitudinal study[J]. BONE, 2013, 52(1): 400-406
- [18] 尹军, 高传芳, 浅议 TGF- β 与原发骨质疏松[J]. 临床医学, 2011, 30(26): 86-87
- Yin Jun, Gao Chuan-fang. Shallow discussion TGF- β and primary osteoporosis[J]. China Foreign Medical, 2011, 30(26): 86-87
- [19] Sila Asna M, Bunyaratvej A, Maeda S, et al. Osteoblast differentiation and formation gene expression in strontium inducing bone marrow mesenchymal stem cell [J]. Kobe J Med Sci, 2007, 53(12): 25-35
- [20] Zhao L, Jiang S, Hantash BM, et al. Transforming Growth Factor β Induces Osteogenic Differentiation of Murine Bone Marrow Stromal Cells[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(2): 725-733
- [21] Jia Yi-jie, Tian Jing. Stem cells treatment for osteoporosis: Possibility and feasibility [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2012, 16(1): 148-152