雌激素、细胞因子与绝经后骨质疏松症

孙铁铮 吴荣福 陶天遵

近年来的研究表明，雌激素的缺乏是绝经后骨质疏松症的发病中的重要因素。雌激素调节骨髓细胞、骨细胞产生细胞因子、生长因子调控骨改建过程。这方面的研究日益增多。本文就这一领域中的前沿进展作一综述。

1 雌激素是作用于骨组织的重要介质

目前，已经证实在骨微环境中产生大量的免疫及造血因子，这些复杂的、作用相互重叠的因子影响骨的形成与吸收，其中主要包括白细胞介素-1α(IL-1α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子α(TNF α)、肿瘤坏死因子β(TNF β)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、颗粒一巨噬细胞集落刺激因子(GM-GSF)。

IL-1与TNF是最强的骨吸收促进剂，而且抑制骨的形成。IL-1与TNF通过作用于成骨细胞间接激活成熟的破骨细胞，并抑制破骨细胞的凋亡[1]。另外，它们都可通过直接刺激前破骨细胞增殖，增强基质细胞中前破骨源性细胞的活性来促进破骨细胞的形成[2]。IL-1，TNF是其它调节破骨细胞前体细胞分化为成熟破骨细胞的因子如IL-6，M-CSF，GM-CSF的重要诱导剂。因此，就破骨细胞的形成而言，IL-1与TNF是必须的"上游"细胞因子，诱导那些具有促进造血干细胞中前破骨细胞分化作用的"下游"细胞因子的分泌。这种级联效应使IL-1、TNF水平上的微量变化即可引起破骨细胞形成的巨大改变。

另一种引为关注的因子为IL-6。它主要通过细胞表面受体，包括配体结合链和信号转导链gp130发挥作用。当与可溶性白细胞介素-6受体(SIL-6R)结合时，IL-6促进人及小鼠破骨细胞的早期形成。IL-6在富含前破骨细胞的胎鼠的掌骨培养中促进骨吸收[3]，而在富含成熟的破骨细胞如胎鼠桡骨培养中则无此作用[4]。IL-6对骨吸收的作用仍存在争论，因为阻断IL-6并不能降低骨吸收。IL-6的水平与绝经后骨质疏松症的相关指标无相关性；在过度表达IL-6的转基因小鼠中未出现骨质疏松的情况[5]。但是IL-6确实在裸鼠中引发了高钙血症。

CSF的基本作用在于促进前破骨细胞的增殖、分化。这已通过将M-CSF基因敲除的op/op小鼠出现骨质疏松而得到证实。此实验中，在M-CSF基因编码区插入额外的一个胸腺嘧啶T，造成编码序列突变而产生一个终止密码子，导致M-CSF缺陷型[6]。GM-CSF是已知生长因子、细胞因子中作用最强的促前破骨细胞生成因子。虽然抗M-CSF抗体可完全阻断小鼠破骨细胞的形成，而GM-CSF抗体却不能，但GM-CSF对于人破骨细胞前体的分化、增殖仍是至关重要的[7]。

2 绝经及雌激素替代治疗对促骨吸收细胞因子的影响

研究表明，雌激素缺乏情况下可大量产生五种细胞因子：IL-1、IL-6、TNF、M-CSF、GM-CSF。

观察证实，绝经后骨质疏松病人单核细胞分泌大量IL-1，而在雌/孕激素治疗后降低。以后的研究表明绝经后IL-1活性增高缘于雌激素对IL-1β、IL-1抑制剂、IL-1rα的产生发挥综

作者单位：100044 北京医科大学人民医院关节病诊疗与研究中心(孙铁铮) 黑龙江省拜泉人民医院外科(吴荣福) 哈尔滨医科大学第二临床医学院(陶天遵)

合作用的结果。正常妇女行卵巢切除术后，雌激素的减少不仅与 IL-1、TNF 的增加有关，而且与 GM-CSF 密切相关。这些细胞因子水平改变的时间顺序与 IL-1、TNF、GM-CSF 在卵巢切除后诱导骨丢失发生中所起的作用一致[8]。IL-1、TNF 可以促进 GM-CSF 在基质细胞中产生。虽然 GM-CSF 的增加发生于二者水平改变以后，它也是雌激素减少的直接结果。Rolston 等人研究表明：未经治疗的绝经后妇女骨细胞的 IL-1、TNF、IL-6的 mRNA 较经雌激素替代治疗者丰度更高[9]。尽管雌激素调节 IL-1、TNF 的分子机制尚未完全清楚，但已在单核细胞、巨噬细胞上发现雌激素受体，雌激素可以降低单核细胞中 IL-1 mRNA 的稳态水平，且在人单核细胞株的研究中转染雌激素受体及 IL-1/CAT、TNF/CAT 结构后，发现雌激素可下调 IL-1、TNF 启动子的活性[10]。这种影响可能是间接的，因为 IL-1、TNF 的启动子中无雌激素作用元件。

IL-1、TNF 诱导基质细胞和成骨细胞中 IL-6的产生被雌激素增加所抑制，被雌激素减少所促进。实验证实去卵巢小鼠的骨髓培养中 IL-6产生增加。这种效应，至少在小鼠中被认为是雌激素间接影响了 IL-6启动子近端225bp 的转录活性[11]。尽管有人应用人细胞系实验也表明雌激素对人 IL-6启动子具有抑制作用，在三种不同的人基质/骨细胞株中却都未能证明雌激素对于表达功能性雌激素受体的骨细胞、基质细胞 IL-6的产生具有抑制作用。如上材料提出一种可能性，雌激素缺乏情况下人体 IL-6的产生并未增加。临床病例总结发现，外科手术造成的绝经并不伴有 IL-6的增高，却引起 SIL-6R 的上升。雌激素可调节 SIL-6R 在骨细胞中的产生，gp130的表达，调控破骨细胞和成骨细胞前体对 IL-6等利用 gp130转导信号的细胞因子的反应，如 IL-11及白血病抑制因子(LIF)。因此，雌激素调控骨转换的另一机制可能在于其调节骨细胞对应用 gp130的细胞因子及与活化可溶性受体相结合因子的反应。

3 细胞因子缺乏及细胞因子抑制剂是研究雌激素缺乏骨丢失中特定因子作用的工具

细胞因子对骨具有多重作用，所以将重组的细胞因子注入动物体内诱导骨的丢失并不能表明它们在雌激素引发的骨丢失中发挥中介作用。证明细胞因子、骨丢失和雌激素缺乏间存在因果关系更具说服力的方法是造成细胞因子的缺失或功能阻断可以防止绝经或行卵巢切除术导致的骨丢失。

转基因技术的建立使我们深入探明基因与特定表型的关系及确定多数蛋白质的功能成为可能。尽管这种方法已经被用来证明细胞因子是卵巢切除诱发骨丢失中的致病因素，应该强调的是绝经后骨质疏松症是在正常骨骼发育的基础上雌激素缺乏的结果。动物已达成熟时不允许因为缺乏灭活的启动子而"转换"一个基因。因此行"基因敲除"的小鼠在胎鼠发育阶段即存在骨改建与骨再建的缺陷，从而导致发育异常骨骼的形成。这是因为单个基因的缺失可以导致其他基因表达和发育程序的改变[12]。而且，"基因代偿"现象会诱发不稳定表型，使细胞因子功能的识别不可预知。尽管存在这些限制，已发现卵巢切除不能诱发 IL-6缺乏小鼠的骨丢失。然而同一研究组近来观察 IL-6缺乏小鼠的第三代表达更稳定的表型，不能防止卵巢切除后出现的骨丢失。因此尚需进一步研究 IL-6缺失小鼠的特定表型以决定 IL-6在卵巢切除诱导骨丢失中的作用。

另外一种不受上述限制的方法是通过注入特定抑制剂如 IL-1拮抗剂，IL-1受体拮抗剂(IL-1rα)、TNF 拮抗剂，TNF 结合蛋白(TNF-bp)或抗 IL-6抗体到成熟的动物体内以阻断细胞因子的功能活性。

在成熟大鼠同时应用 IL-1rα，TNFbp 成功地阻断了卵巢切除后第一个月内发生的骨丢失和骨吸收的增加。在卵巢切除后的第二个月给成熟大鼠注入 IL-1rα 足以阻断骨丢失并产生同雌激素替代治疗相似的结果。以上表明，IL-

Irα、TNF 在卵巢切除诱导骨丢失的发生中发挥关键的致病作用，单个因子的作用随时间的推移而发生改变。IL-1、TNF 介导卵巢切除诱发骨丢失的特定作用也是种属依赖性的，例如小鼠卵巢切除后的早期阶段单独应用 TNFbp 可产生雌激素样的预防效果[13]，而在大鼠 TNFbp 只能降低却不能完全阻断卵巢切除诱导的骨丢失。TNF 的关键作用在过度表达可溶性 TNF 受体的转基因小鼠卵巢切除后不能诱导骨丢失的出现而得到进一步证实[14]。相反，注入抗 IL-6抗体不能防止骨丢失和在体情况下卵巢切除后骨吸收的增加，尽管 IL-6可以促进破骨细胞及其前体的形成；阻断 IL-6可以降低破骨细胞的形成而不足以防止卵巢切除导致的骨丢失，这可能因为雌激素调节"上游"因子的产生不需要 IL-6来诱发。相应的，在雌激素缺乏的情况下，IL-1、TNF 甚至可在缺乏 IL-6 的情况下刺激骨吸收的增加。

研究表明，IL-1rα 或 TNFbp 皆可单独阻断卵巢切除后破骨细胞产生的增加。因此 IL-1 与 TNF 可能在破骨细胞的生成上具有协同或顺序效应[15]。既然联合应用 IL-1rα、TNFbp 才能阻断去卵巢后早期骨丢失，IL-1与 TNF 极可能独立且多重地活化破骨细胞，造成去卵巢后骨吸收快速增加。IL-1、TNF 促进破骨细胞生成的具体机制仍待进一步研究。近期实验表明卵巢切除小鼠的基质细胞较雌激素替代治疗小鼠产生更多的 M-CSF，而这种现象可被 IL-1rα、TNFbp 阻断，这说明去卵巢小鼠骨微环境中高水平表达 IL-1、TNF 导致富产 M-CSF 细胞群体的选择和增加。

细胞因子间具有潜在的协同效应，在骨微环境中几个促骨吸收因子浓度较小的波动即可引起骨吸收的相应改变。因此，充分了解因子间相互辅助作用，正确认识绝经后骨丢失中单个细胞因子作用随时间而改变，对于弄清雌激素作用于骨的机制是必要的。转基因小鼠通过活化/灭活启动子的功能可能导致雌激素调节细胞因子整合作用的进一步划分[16]，从而为应用细胞因子抑制剂治疗绝经后骨质疏松症奠定基础。

参 考 文 献

1 Hughes DE, Jilka RL, Manolagas S, et al. Sex steroids promote osteoclast apoptosis in vitro and in vivo. J Bone Miner Res, 1995, 10(abstract 48).

2 Srivastava S, Mchugh K, Kimble R, et al. Estrogen downregulates the expression of M-CSF mRNA in bone marrow stromal cells by stimulating the production of the transcription factor EGR-1. J Bone Miner Res, 1995, 10(suppl 1): s18.

3 Lowik CWGM, Van der Pluijm G, Bloys H, et al. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate IL-6 production by osteogenic cells: a possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Common, 1993, 162: 1546～1552.

4 Roodman GD. Interleukin-6: an osteotropic factor? J Bone Miner Res, 1992, 7: 475～478.

5 Woodroofe C, Muller W, Ruther U, et al. Long-term consequences of interleukin-6 over expression in transgenic mice. DNA Cell Biol, 1992, 11: 587～592.

6 Yoshida HS, Hayashi S, Kunisada T, et al. The murine mutation osteoporosis is in the coding region of macrophage colony stimulating factor gene. Nature, 1990, 345: 442～444.

7 Matayoshi A, Brown C, Dipersio J, et al. Generation of human osteoclasts from peripheral blood cd 34+cells. J Bone Miner Res, 1995, 10(abstract 7298).

8 Pacifici R, Brown C, Puscheck E, et al. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 5134～5138.

9 Ralston SH. Analysis of gene expression in human bone biopsies by polymerase chain reaction: evidence for enhanced cytokine expression in postmenopausal osteoporosis. J Bone Miner Res, 1994, 9: 883～890.

10 Kimble RB, Srivastava S, Bellone CJ, et al. Estrogen inhibits IL-1 and TNF gene expression in transfected murine macrophage cells. J Bone Miner Res, 1996, 11 (suppl 1).

11 Ray A, Prefontaine KE, Ray P, et al. Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor. J Biol Chem, 1994, 269: 12940～12946.

12 Routtenberg A. Knock out mouse fault lines (letter). Nature, 1995, 374: 314～315.

13 Kimble RB, Bain SD, Kung K, et al. Inhibition of IL-6 activity in genetically normal mice does not prevent ovariectomy-induced bone loss. J Bone Miner Res, 1995, 10(suppl 1): S160.

14 Ammann P, Garcia I, Rizzoli R, et al. Transgenic mice expressing high levels of soluble tumor necrosis factor receptor-1 fusion protein are protected from bone loss caused by estrogen deficiency. J Bone Miner Res, 1995, 10 (suppl 1): (abstract 1).

15 Kimlle RB, Vannice JL, Brownfield C, et al. Persistent bone-sparing effect of interleukin-1 receptor antagonist: a hypothesis on the role of IL-1 in ovariectomy-induced bone loss. Calcif Tissue Int, 1994, 55: 260～265.

16 Pacifici R. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. J Bone Miner Res, 1996, 8: 1043～1051.

(上接第36页)

5 Lee MS, Kim SY, Lee MC, et al. Negative correlation between the change in bone mineral density and serum osteocalcin in patients with hyperthyroidism. J Clin Endocrinol Metab, 1990, 70(3): 766～770.

6 Garre DR, Delmas PD, Malaval L, et al Serum bone Gla protein: a marker of bone turnover in hyperthyroidism. J Clin Endocrinol Metab, 1986, 62(5): 1052～1055.

7 Garnero P, Vassy V, Bertholin A, et al. Markers of bone turnover in hyperthyoidism and the effects of treatment. J Clin Edocrinol Metab, 1994, 78(4): 955～959.

8 程梅芬，杨秀芳，王洪复，等. raves 病中某些骨代谢指标的测定. 中华内分泌代谢杂志，1990，6(3)：160～162.

9 罗国春，李振甲，陈淑娟，等. 甲状腺功能亢进症患者血清钙、甲状旁腺激素的变化. 中华内分泌代谢杂志，1988，4(1)：24～25.

10 Burman, KD, Monchik JM, Earll JM, et al. Ionized and total serum calcium and parathyroid hormone in hyperthyroidism and hypothyroidism. Ann Intern Med, 1976, 84(6): 668～671.

'99年第三届国际骨质疏松研讨会

经上级批准，中国老年学学会骨质疏松委员会、中国老年学学会老年医学委员会和中国骨质疏松杂志社经过三年的筹备定于1999年3月31日—4月3日在西安召开第三届国际骨质疏松研讨会(简称西安会议)。

研讨会专题：1. 原发性骨质疏松症；2. 继发性骨质疏松症；3. 特发性骨质疏松症；4. 中医中药。以上四个方面应包含病因、病理、生化、诊断及鉴别诊断、骨矿测量、流行病学、临床治疗药物及方法、预防、诊断治疗设备和药品的开发等新成果。

评奖：1)'99国际会议青年学者优秀论文奖10名，每名3000元(限45岁以下)。2)默沙东公司设福善美优秀论文奖30名，每名2000元。3)石家庄制药集团设"固邦-回报母亲"优秀论文奖50名，每名3000元；特别奖2名，每名5000元。稿件应分别注明青年学者优秀论文奖征文、福善美优秀论文奖征文和"固邦-回报母亲"奖征文。每人只有一次获奖机会。

会议期间，欢迎厂家参展。来信索取通知。

来函请寄：北京朝阳区惠新里38号邮编：100029

中国骨质疏松杂志社办公室孙继荣、金信爱主任收

联系电话：(010)64985881；64976420

传　　真：(010)64976421　E-mail：cgsoc@hns.cjfh.ac.cn