

卵巢摘除大鼠外周血单核细胞 ER-mRNA 表达与骨小梁退变的相关研究

程云英 卢守莲 任慕兰 庄育红

〔摘要〕 目的 探讨外周血单核细胞及其雌激素受体(ER)mRNA 表达水平,在绝经后骨质疏松发生机理中所起的作用。方法 成年雌性 SD 大鼠 30 只,随机分 3 组,去势组(OVX 组),假手术组(Sham 组),OVX+Premarin 组(ERT 组)。术后 6 周后采各大鼠心脏血,分别以①用放免法测定血清雌二醇;②外周血单核细胞计数以及分离培养纯化单核细胞后运用 RT-PCR 法检测 ER-mRNA;③各组行骨组织形态计量学测定。结果 ①OVX 组与 Sham 组相比,血清 E_2 显著下降($P<0.01$)。外周血单核细胞(PBM)数显著升高($P<0.01$),而 PBM 的 ER-mRNA 表达显著降低($P<0.01$),骨组织形态计量学检查 OVX 组显示骨小梁面积、骨小梁宽度、皮质骨面积、骨小梁游离末端数均明显降低($P<0.05$),而骨小梁表面破骨细胞数、骨矿化沉积率、骨矿化缘长度及骨小梁间距等都显著增加($P<0.05$, $P<0.01$),②ERT 组的血清 E_2 、PBM 数及其 ER-mRNA 与 Sham 组相比无显著差异($P<0.05$),骨量及显微结构亦无明显减少和破坏($P<0.05$),但与 OVX 组相比,则各项指标均有显著差异($P<0.05$)。结论 ①卵巢切除后骨量丢失可能与单核细胞表达 ER 量减少,使单核细胞向破骨细胞的分化增多,而使骨吸收增强有关。②激素替代治疗可能通过调节单核细胞数及其 ER 的表达而起抗骨质疏松的作用。

〔关键词〕 单核细胞 ER-mRNA(雌激素受体 mRNA) 绝经后骨质疏松 骨组织形态计量学 激素替代治疗

Correlation of ER-mRNA expression of peripheral blood monocytes with trabecular bone degeneration in ovariectomized rats Cheng Yunying, Lu Shoulian, Ren Mulan, et al. Department of Obstetrics and Gynecology, Teaching Hospital, Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009, China

〔Abstract〕 **Objective** To study the role of peripheral blood monocytes in the mechanism of postmenopausal osteoporosis in ovariectomized rats. **Methods** Thirty female SD rats were randomly allocated to three groups. Group 1: ovariectomized (OVX); Group 2: sham-operated (Sham); Group 3: OVX + premarin (ERT). Six weeks after operation, all rats were killed by taking blood from the heart. Then we measured the concentration of E_2 in blood by RIA, counted the number of monocytes and measured the level of ER-mRNA in the monocytes by semiquantitative RT-PCR. The proximal femurs were embedded undecalcified for histomorphometric analysis. **Results** (1) Compared with Sham group, the concentration of E_2 in blood and the level of ER-mRNA in monocytes declined significantly in OVX ($P<0.05$), but the number of peripheral blood monocytes increased ($P<0.05$). By histomorphometric analysis the trabecular bone volume, mean cortical thickness, the number of free trabeculae in OVX decreased ($P<0.05$); however, the number of osteoclasts was higher than that in Sham group ($P<0.05$). The trabeculae were thin and irregular which changed the bone structure. (2) There were no significant differences in the above parameters between the ERT group and the Sham group. **Conclusion** Ovarian

作者单位:南京铁道医学院附属医院妇产科

作者简介:程云英 女,1960年毕业于南京医科大学,教授,主任医师,硕士生导师,从事妇产科工作40余年,尤专长于妇科肿瘤和妇科内分泌研究,已发表论文40余篇,科研成果三项

steroids deficiency induces the increase in number of peripheral blood monocytes and the decline of ER-mRNA expression in monocytes, which is important for the osteoclastogenesis. The change is crucial for the postmenopausal osteoporosis. Menopause causes a high bone turnover and a decline of bone mechanical strength. ERT is able to inhibit bone absorption by modulating the monocytes and its effects through the ER in the monocytes.

[Key words] Monocytes; ER-mRNA; Postmenopausal osteoporosis; Bone histomorphometric analysis; Estrogen replacement therapy

1995 年 Ben-Hur 报道绝经后妇女外周血单核细胞数明显增多, ER 阳性单核细胞数目减少, 而接受雌激素替代治疗(ERT)无此变化^[1]。这提示单核细胞 ER 的表达量与体内雌激素的变化有一定相关性。本实验采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)直接检测单核细胞 ER-mRNA 的表达, 以进一步探讨外周血单核细胞 ER-mRNA 的表达与绝经后骨质疏松发生相关性。

1 资料和方法

1.1 研究对象: 选取 3 月龄雌性 SD 大鼠(普通级)30 只, 体重(217±5)g, 随机分为 3 组, 每组 10 只。经 2% 戊巴比妥钠 40mg/kg 体重腹腔内注射麻醉后, 一组行双侧卵巢切除(OVX 组), 对照组单纯行开、关腹(Sham 组), 另一组行双侧卵巢切除后给 Premarin 替代(ERT 组)。各组间大鼠体重无统计学差异。术后置大鼠在室温下饲养, 自由饮水和食物。术后 5 d, 切口愈合后开始给药。ERT 组 Premarin 按人鼠剂量换算^[2]以无菌生理盐水配成混悬液、以 2ml/只/日灌胃给药, OVX 组及 Sham 组均以无菌生理盐水 2ml/只/日灌胃处理。连续用药 6 周后处死。在处死前 10d 及前 3d 分别给与盐酸四环素 20mg/kg 体重腹腔内注射。服药后 6 周, 采大鼠心脏血 6 ml, 作单核细胞培养、单核细胞的 ER-mRNA 的表达水平及血清雌激素水平测定, 同时分离双侧股骨远端干骺段 1 cm, 作骨组织计量形态学测量。

1.2 方法及检测指标: (1)单核细胞分离及培养: 参见文献^[3]; (2)外周血单核细胞总 RNA

提取: 高纯 RNA 分离试剂盒购自德国宝灵曼公司, 按说明书操作; (3)RT-PCR: 应用一步法 RT-PCR 试剂盒购自德国宝灵曼公司。引物序列如下^[4]: P₁: 5'-GGA GAT ATG AGA GCT GCC AA-3'; P₂: 5'-CCA GCA ACA TGT CAA AGA TC-3'; 扩增片段长 439bp, 位于雌激素结合区及部分 DNA 结合区编码序列。内参 actin 引物序列由上海生物工程公司合成, 参照文献^[5]。P₁: 5'-AGA GAG AAG ATG ACA CAG ATC ATG TTT GAG-3'; P₂: 5'-GAA GAC TTT GCG GTG GAC AAT GGA-3'; 根据扩增带荧光强度分为阳性、弱阳性、阴性 3 种。(4)半定量 RT-PCR: 除 RT-PCR 为阳性结果外, 其余的样品于反应体系中另加入 actin 引物 P₁, P₂ 各 20pmol, 置入 45℃ 恒温水浴箱 30 min, 行逆转录反应后, 进行电泳分析, 将各胶面于紫外灯下经 Beckman DU-70 扫描仪扫描, 储存于计算机中, 经计算机全自动图像分析系统分析, 以每个体系中内参光密度为对照, 半定量测算各个体系中扩增产物的量。(5)血清雌二醇测定: 放射免疫法测定, 试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司, 回收率 95%~104%, 批内变异系数 3.8%, 批间变异系数 4.8%, 灵敏度 4pg/ml。

1.3 骨组织形态计量学测量^[6]: 取大鼠股骨远端干骺端 1 cm 长骨组织, 丙酮脱水、脱脂、低温塑料包埋, 4℃ 冰箱聚合, 用德国 JUNG 型硬切骨机作 20μm 和 5 μm 不脱钙切片, 5 μm 切片用甲苯胺兰染色, 其中 20 μm 切片直接在荧光显微镜下用网状微尺测算各个参数值, 5 μm 切片通过计算机全自动图像分析系统测算有关参

数值,各个测量参数均采用高倍视野,每个标本取5个视野测量参数值后取平均值,其中视野面积定为 $315699.8\mu\text{m}^2$,经换算处理,测量指标如下:骨小梁面积百分比($\%$)、皮质骨面积百分比($\%$)、骨小梁平均宽度(μm)、骨小梁间距(μm)、骨小梁游离末端数(个)、骨小梁表面破骨细胞数($10^{-3}\text{N}/\mu\text{m}$)、骨小梁骨矿化率($\mu\text{m}/\text{D}$)、矿化缘长度($\%$)。

1.4 统计学处理:等级资料组间差异采用秩和检验,计量资料所有参数均以均数 $\pm$ 标准差表示,组间差异采用方差分析,显著性 t 检验。

2 结果

2.1 外周血雌二醇含量及单核细胞数变化

OVX组外周血雌二醇含量显著低于Sham组($P<0.01$),而单核细胞数(PBM)显著高于Sham组($P<0.01$),ERT组外周血雌二醇与Sham组相比差异无显著性($P<0.05$),且单核细胞数未见明显增多,与Sham组相比无显著差异($P<0.05$)。

表1 外周血 E_2 及单核细胞数($\bar{x}\pm s$)

指标	OVX	Sham	ERT
$\text{E}_2(\text{pg/ml})$	2.768 ± 0.160	6.767 ± 0.182	6.623 ± 0.143
$\text{PBM}(1\times 10^5/\text{ml})$	4.5 ± 0.2	3.02 ± 0.15	2.97 ± 0.17

注:各组 $n=10$

2.2 外周血单核细胞ER-mRNA表达改变

RT-PCR产物经电泳结果显示,Sham组10只大鼠全部出现阳性扩增带,ERT组10只中8只出现阳性扩增带,另两只弱阳性,OVX组10只中8只出现弱阳性带,2只阴性,未经逆转录过程的RNA样品,无1例出现阳性扩增带,可以排除残留DNA扩增。经秩和检验,OVX组与Sham组间差异有显著性($P<0.05$),OVX组与ERT组间差异亦有显著性($P<0.05$),见图1。

2.3 外周血单核细胞ER-mRNA半定量分析结果

经扫描及计算机分析显示,OVX样品扩增量明显低于Sham组及ERT组($P<0.01$),而Sham组与ERT组间差异无显著性($P>0.05$)。

表2 半定量RT-PCR结果($\bar{x}\pm s$)

指标	OVX	Sham	ERT
n	8	10	10
半定量RT-PCR	0.21 ± 0.07	0.95 ± 0.08	0.90 ± 0.07

2.4 骨组织形态计量学测量参数结果

OVX组骨矿化率、骨小梁表面破骨细胞数、矿化率长度、骨小梁间距较Sham组显著增加($P<0.05$, $P<0.01$);骨小梁面积、骨小梁平均宽度、皮质骨面积、骨小梁游离末端数较Sham组显著减少($P<0.01$),而ERT组与Sham组间各参数均无统计学差异($P>0.05$)。

表3 骨组织形态计量学参数结果($\bar{x}\pm s$)

指标	OVX	Sham	ERT
骨小梁平均宽度(μm)	70.3 ± 7.5	86.3 ± 7.1	84.1 ± 6.3
骨小梁间距(μm)	203 ± 18.1	148 ± 20.2	158 ± 19.5
骨小梁游离末端数(n)	2.2 ± 0.27	2.81 ± 0.3	3.7 ± 0.26
骨小梁面积百分比($\%$)	30.1 ± 4.1	45.2 ± 3.6	43.1 ± 4.5
皮质骨面积百分比($\%$)	1.93 ± 0.41	2.81 ± 0.35	2.76 ± 0.38
骨小梁表面破骨细胞数($10^{-3}/\mu\text{m}$)	1.3 ± 0.5	0.58 ± 0.2	0.60 ± 0.3
骨小梁矿化率($\mu\text{m}/\text{D}$)	1.67 ± 0.24	1.18 ± 0.24	1.16 ± 0.23
骨小梁矿化缘长度($\%$)	61.1 ± 10.5	43.2 ± 6.8	44.5 ± 6.3

注:各组 $n=10$

3 讨论

3.1 外周血单核细胞ER表达及其与骨质疏松的关系

1984年有学者证明外周血单核细胞移行到骨表面可相互融合,形成破骨细胞,提出单核细胞为破骨细胞的前体细胞^[7]。本研究结果显示大鼠双卵巢切除6周后,外周血雌二醇含量显著低于Sham组,而外周血单核细胞数明显增多,骨组织形态计量学测量结果骨小梁表面

的破骨细胞数比 Sham 组有显著增加,提示雌激素对破骨细胞的合成、分化过程有调节作用。

雌激素是通过受体起作用的,体外培养破骨细胞证实其表面有雌激素受体存在,说明雌激素可通过受体调节破骨细胞的活性,Oursler MJ^[8,9]等证实在破骨细胞培养基中加入不同剂量雌激素,显示破骨细胞吸收骨量的能力随雌激素量的增多而下降,说明破骨细胞为雌激素作用的靶器官。雌激素是通过其受体起作用的,那么单核细胞为破骨细胞的前体细胞,是否表达 ER,文献未见报道。本实验选用 RT-PCR 法检出单核细胞有 ER-mRNA 的表达,且单核细胞 ER-mRNA 的表达量与骨小梁表面破骨细胞数呈负相关,提示单核细胞形成破骨细胞的能力受雌激素抑制,单核细胞表达 ER 减少,导致破骨细胞形成增多,骨吸收增加。

3.2 激素替代治疗的作用

激素替代是治疗绝经后骨质疏松的基本手段,本实验表明 ERT 组外周血雌二醇含量与 Sham 组无明显差异,且单核细胞 ER-Mrna 的表达及骨组织形态计量学各项指标均与 Sham 组无明显差异,反映雌激素在维持骨量方面有确切的疗效。雌激素长期用可能产生不必要的影

响,如 Ratoxifene^[10],仅对骨组织及心血管系统有雌激素作用,对其他组织则起雌激素拮抗作用,可避免长期用药的不良影响,这是受体学说的延伸,其机制尚进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 Beu-Hur H, Mor G, Insler V, et al. Am J Reprod Immunol, 1995, 34(6): 363-369.
- 2 施新猷. 医学动物实验方法. 西安: 陕西科学技术出版社, 1989. 422.
- 3 Pacifici R, Rifas L, Teitelbaum S, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1987, 84(13): 4616-4620.
- 4 Koike S, Sakai M, Muramatsu M, et al. Nucleic Acids Res 1987, 15(6): 2499-2513.
- 5 Donna N, et al. Identification of estrogen receptor β , a functional variant of estrogen receptor β expressed in normal rat tissues. Endocrinology, 1988, 139(3): 1082-1092.
- 6 Robert R. Bone histomorphometry techniques and interpretation. CPC Press Inc, 1983, 37-52.
- 7 Zamboni Zallone A, TeTi A, Primavera MV, et al. J Cell Sci, 1984, 66: 335-342.
- 8 Oursler MJ, Osadoby P, Pyfferoen J, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(15): 6613-6617.
- 9 Oursler MJ, Pederson L, Fitzpatrick L, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(12): 5227-5231.
- 10 Balfour JA, Goa KL. Drugs Aging 1998, 12(4): 335-41, 342.

1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society (IBMS) and the European Calcified Tissue Society (ECTS) is to be held in Madrid, Spain from June 5 to June 10, 2001.

Deadline for abstracts December 1, 2000

Pre-registration June 1, 2001

第一届国际骨矿学会和欧洲钙化组织学会联合会议

将于 2001 年 6 月 5 日至 6 月 10 日在西班牙马德里举办

论文截止日期: 2000 年 12 月 1 日

提前注册日期: 2001 年 6 月 1 日

E-mail: BEAPBMRC@ 263. net