

卵巢切除大鼠骨组织白细胞介素-6的基因表达和细胞定位

涂意辉 杜靖远 杨安礼

【摘要】 目的 观察卵巢切除大鼠骨组织白细胞介素-6(IL-6)的基因表达及细胞定位。方法 大鼠的双侧卵巢被切除2个月后,通过RNA斑点杂交直接测骨组织IL-6 mRNA的表达,通过原位杂交判断产生IL-6的细胞并进行细胞定位。结果 卵巢切除大鼠骨组织IL-6 mRNA表达明显升高,为对照大鼠的2.4倍($P < 0.01$)。骨衬里细胞、成骨细胞和骨细胞具有较强的IL-6 mRNA杂交信号。结论 骨组织成骨细胞系表达IL-6 mRNA,卵巢切除导致IL-6 mRNA的表达升高。IL-6在卵巢切除大鼠骨丢失中可能起重要作用。

【关键词】 白细胞介素-6; 卵巢切除; 斑点杂交; 原位杂交

Expression and cellular location of interleukin-6 in ovariectomized rats TU Yihui, DU Jingyuan, YANG Anli, Department of Orthopedics, Yangpu Central Hospital, Shanghai 200090, China

【Abstract】 Objective To observe the expression and cellular location of interleukin-6(IL-6) mRNA in bone tissue of ovariectomized rats. **Methods** Ovaries of rats were excised to produce ovariectomized rat models. The expression of IL-6 mRNA in bone tissue was determined by dot blot hybridization and *in situ* hybridization, respectively, 8 weeks after surgery. **Results** The expression levels of IL-6 mRNA significantly increased in ovariectomized rats, as compared with in control rats (87.81 ± 12.36 vs 36.41 ± 4.87 IOC, $P < 0.01$). Strong IL-6 mRNA hybridization signals were detected in lining cells, osteoblasts and osteocytes. **Conclusion** Loss of ovarian function induced *in vivo* increases IL-6 mRNA expression of osteoblast lineage. IL-6 may play an important role in bone loss.

【Key words】 Interleukin-6 Ovariectomy Dot blot hybridization *In situ* hybridization

骨质疏松是一个严重危害大众健康的疾病,绝经后骨质疏松和与此相关的骨折发生率升高,影响着大约1/3老年妇女^[1]。因此,对于骨质疏松的研究日益受到重视,但关于雌激素缺乏所导致的骨转换不平衡的分子机制目前尚不清楚。本实验制备卵巢切除大鼠骨质疏松模型,通过斑点杂交和原位杂交技术,直接检测骨组织白细胞介素-6(IL-6)mRNA的表达并进行细胞定位,以探讨IL-6在卵巢切除大鼠骨丢失中的作用。

材料和方法

1. 动物模型:9月龄雌性SD大鼠24只,体重260~300g,由同济医科大学实验动物中心提供。12只作为对照组,只暴露双侧卵巢而不予以切除,另12只作为卵巢切除组,完整切除双侧卵巢,所有动物自由饮水,标准饲料喂养。

2. 骨标本的制备:手术后2个月,每组6只大鼠麻醉下处死,双侧股骨和胫骨被取出,剔除其上附着的软组织,立即置入盛有液氮的碾钵中碾成粉末,装入EP管,液氮中保存。每组另外6只大鼠麻醉后心脏灌注4%多聚甲醛100ml,取出右侧胫骨和L₁,4%多聚甲醛继续固定24h,PBS充分漂洗,10%EDTA/PBS(pH7.4)4℃脱钙,隔天换液一次,三周后L₁椎体浸入30%蔗糖中4℃过夜,以备切取冰冻切片。右侧胫骨干骺端常规制成石蜡切片,光镜观察骨小梁结构。

3. IL-6 cDNA 探针的制备:含hIL-6全长cDNA的重组质粒PGEM-4由英国牛津大学ZD Xia教授提供。碱变性法大量制备的质粒DNA经EcoRI酶切,获取IL-6 cDNA特异性片段(990bp),纯化后,采用德国B·M公司地高辛高效引物试剂盒,地高辛标记IL-6 cDNA探针。

4. 斑点杂交:称取200mg骨粉末,采用异硫氰酸胍一步法提取骨组织总RNA,溶于适量DEPC水

作者单位:200090 上海市杨浦区中心医院骨科(涂意辉、杨安礼);同济医科大学附属协和医院骨科(杜靖远)

中,将 RNA 标本浓度调至 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$,取 $10 \mu\text{l}$ RNA 点膜,与地高辛标记的 IL-6 cDNA 探针进行杂交。杂交斑点的光密度值(IOD)通过同济-太阳 MPIGS-500 图像分析系统进行测定。

5. 原位杂交:经 30% 蔗糖浸过夜的 L_1 椎体切成 $3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ 大小的骨块,使用 CM1505 冷冻切片(Leica 公司) -20°C 条件下切取 $25 \mu\text{m}$ 厚骨组织切片,每张切片滴加预杂交液 $50 \mu\text{l}$, 42°C 烤箱中温育 2 h,然后每张切片滴加 $10 \sim 20 \mu\text{l}$ 变性杂交液(探针浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$) 42°C 烤箱中温育 16 h, SSC 洗切片,再滴加碱性磷酸酶标记地高辛抗体 1:500 稀释液,采用 NCIP/NBT 显色,显微镜下观察细胞内有蓝色颗粒沉着为阳性,并设立阴性对照实验。

6. 统计学方法:实验结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,以 t 检验进行统计学处理。

结 果

1. 斑点杂交:卵巢切除后 2 个月,卵巢切除组大鼠骨组织 IL-6 mRNA 表达水平为 (87.81 ± 12.36) IOD,对照组为 (36.41 ± 4.87) IOD,卵巢切除组 IL-6 mRNA 表达显著性升高,是对照组的 2.4 倍 ($P < 0.01$)。

2. 原位杂交:卵巢切除组和对照组大鼠骨组织 IL-6 mRNA 表达均为阳性,较强的杂交信号位于卵巢切除组骨组织中的骨衬里细胞、成骨细胞和骨细胞(图 1~4)。对照试验中,组织切片在杂交前经 RNA 酶处理,及用 PBS 代替 IL-6 cDNA 探针,杂交结果均为阴性。



图 1 IL-6 mRNA 原位杂交 (10 \times)

讨 论

卵巢功能缺乏增加骨改建,并导致骨吸收超过骨形成,产生净骨丢失^[2],但病理机制不甚清楚。体

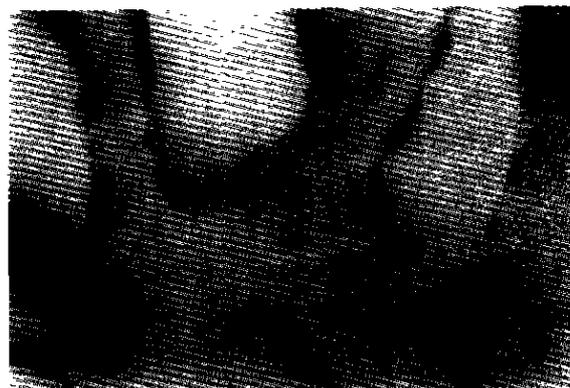


图 2 IL-6 mRNA 原位杂交 (20 \times)

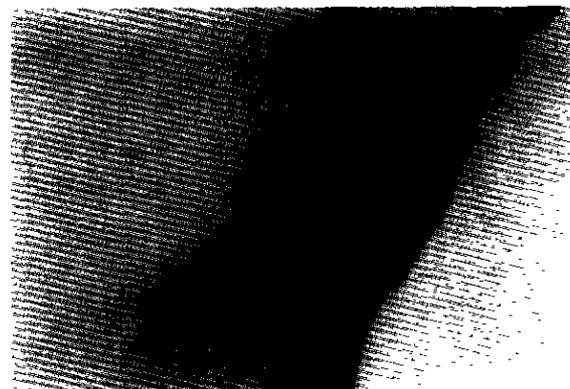


图 3 IL-6 mRNA 原位杂交 (40 \times)



图 4 IL-6 mRNA 原位杂交 (100 \times)

外实验证实,IL-6 能刺激前破骨细胞的募集、增殖、分化和形成新的破骨细胞,并且尚能激活已成熟的破骨细胞,雌激素对成骨细胞分泌 IL-6 具有调节作用^[3]。但在体内,雌激素缺乏是否导致骨组织 IL-6 mRNA 表达升高及骨组织中哪些细胞表达 IL-6 研究很少。

卵巢切除致雌激素缺乏引起的骨丢失与绝经引起的骨量下降,具有许多相似之处,卵巢切除大鼠已被认为是一个研究原发性骨质疏松的理想模型^[4]。本研究利用此模型,通过 RNA 斑点杂交检测体内骨组织 IL-6 mRNA 表达的变化,结果发现,卵巢切除

导致骨组织 IL-6 mRNA 表达升高,与对照组比较,卵巢切除组 IL-6 mRNA 表达升高 2.4 倍 ($P < 0.01$)。骨组织匀浆提取的细胞总 RNA 除来源于骨细胞外,还来源于骨髓细胞。卵巢切除并没有导致鼠骨髓基质细胞 IL-6 mRNA 稳态水平的升高^[5],破骨细胞也不是 IL-6 的主要来源^[6],那么卵巢切除导致骨组织 IL-6 mRNA 稳态水平的升高可能与成骨细胞有关。

原位杂交可判断产生细胞因子的细胞,同时也有助于细胞在骨微环境中的定位。然而对于产生 IL-6 细胞的定位在动物实验中很少有报道,仅有关于人骨组织活检,通过原位杂交研究 IL-6 mRNA 表达的报道^[7]。

本实验利用已建立的骨质疏松模型,进行了手术后 2 个月大鼠骨组织 IL-6 mRNA 原位杂交,结果显示 IL-6 mRNA 杂交信号位于骨组织骨衬里细胞,成骨细胞和骨细胞胞浆内。

TJ Martin 认为成骨细胞家族由成丛的,具有合成功能的成骨细胞及骨衬里细胞和骨细胞组成。骨衬里细胞是位于骨质表面的骨内、外膜细胞,而骨细胞是位于骨陷窝内成熟的成骨细胞,通过骨小管,三种细胞彼此发生功能联系^[8]。本实验首先揭示了在体内骨组织中成骨细胞分泌 IL-6。

成骨细胞通过提供细胞与细胞之间的接触及分泌一些可溶性细胞因子如 IL-6,为破骨细胞生成提供一个合适的微环境。IL-6 与膜结合的或可溶性受体结合导致信号传导子(gp130)同源二聚化,这种受体家族成员的组装激活细胞内一系列激酶,通过蛋白质酪氨酸磷酸化,产生信号传导,而发挥生理功能^[9]。成骨细胞膜上存在雌激素受体^[1],雌激素可直接作用于成骨细胞,影响 IL-6 基因启动子近端 225 bp 序列的活性^[11]。

在正常生理状态下,雌激素作为细胞因子产生的抑制剂而减少成骨细胞 IL-6 的分泌,控制破骨细胞的产生和激活;在雌激素缺乏时,这种抑制作用丧失,成骨细胞分泌大量 IL-6,进入骨微环境中,

刺激更多的破骨细胞生成,导致骨吸收增加^[12]。

股骨干骺端组织学观察发现,卵巢切除导致骨小梁数目减少,游离末端增多,髓腔扩大,证实了卵巢切除后雌激素缺乏产生了骨丢失。

本研究结果提示,卵巢切除导致体内骨组织 IL-6 mRNA 表达水平升高可能由骨组织内成骨细胞系 IL-6 mRNA 表达升高决定的,IL-6 在卵巢切除大鼠骨丢失中起着重要作用。

参 考 文 献

- 1 Kell PJ, Eisman A. Osteoporosis: genetic effects on bone turnover and bone density. *Ann Med*, 1992, 25:99-100.
- 2 Abe T, Chow JWM, Lean JM, et al. Estrogen does not restore bone loss after OVX in the rat. *J Bone Miner Res*, 1993, 8:831-838.
- 3 Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, et al. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:11924-11928.
- 4 Kala DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*, 1991, 15:175-192.
- 5 Van Bezooijen RL, Farb-Sips HCM, Papaoulos SE, et al. IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and TNF- α steady-state mRNA level analyzed by RT-PCR in bone marrow of gonadectomized mice. *J Bone Miner Res*, 1998, 13:185-194.
- 6 Holt I, Davie MWJ, Marshall MJ. Osteoclasts are not the major source of interleukin-6 in mouse parietal bones. *Bone*, 1996, 18:221-226.
- 7 Langub MC, Koszewski NJ, Turner HV, et al. Bone resorption and mRNA expression of IL-6 and IL-6 receptor in patients with renal osteodystrophy. *Kidney Int*, 1996, 50:515-520.
- 8 Martin TJ. Hormones in the coupling of bone resorption and formation. *Osteoporosis Int*, 1993(Suppl 1):s121-s125.
- 9 Manolagas SC, Bellido T, Jilka R. New insights into the cellular, biochemical and molecular basis of postmenopausal and senile osteoporosis: role of IL-6 and gp130. *Int J Immunol*, 1995, 17:109-116.
- 10 Eriksen E, Colvard DS, Berg NJ, et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science*, 1988, 24:83-86.
- 11 Pottratz S, Bellido T, Mocharha H, et al. 17 β -estradiol inhibits expression of human interleukin-6 promoter-reporter constructed by a receptor-dependent mechanism. *J Clin Invest*, 1994, 93:944-950.
- 12 Horowitz MC. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science*, 1993, 260:626-627.

本刊邮发代号 82-198
欢 迎 订 阅 本 刊