

骨质疏松发生一氧化氮机制及雌激素调控作用研究

李昂 卿茂盛 薛延

【摘要】 目的 研究骨质疏松发生的一氧化氮机制及雌激素防治骨质疏松作用的一氧化氮通路,深入理解骨质疏松症病理过程中一氧化氮作用环节。方法 45只SD雌性大鼠分为①假手术组(Sham组);②卵巢切除组(OVX组);③OVX+倍美力治疗(Premarin组)。进行iNOS原位杂交及iNOS、eNOS免疫组化研究,测定其平均灰度值及平均积分光密度(ODI)作统计指标。结果 iNOS原位杂交实验结果显示:正常大鼠去卵巢后,骨髓腔内及骨小梁表面iNOS mRNA有强阳性表达,差异有非常显著性($P < 0.01$),iNOS免疫组化实验结果也显示OVX组iNOS阳性表达明显较Sham组增加;而Premarin组iNOS表达强度较OVX组明显降低($P < 0.05$)。OVX组与Sham组eNOS表达差异无显著性,Premarin组较OVX组eNOS表达强度则明显增加($P < 0.05$)。结论 NO是调节OB、OC功能活动的一种重要效应因子,NO导致细胞因子诱导性骨吸收增强与绝经后雌激素缺乏OP密切相关。雌激素可下调iNOS mRNA表达,抑制iNOS蛋白合成,从而减轻功能亢进的OC性骨吸收,而对骨组织正常生理活动中的eNOS合成,有适度促进作用,有利于骨组织的重建及骨量的恢复,从而重建骨形成-吸收新平衡偶联。

【关键词】 骨质疏松; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 雌激素

Effects of nitric oxide on osteoporosis and regulation and control of estrogen Li Ang¹, QING Maosheng¹, XUE Yan². 1. Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518033, China; 2. Beijing Jishuitan Hospital, Beijing, 100035, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of nitric oxide on osteoporosis and the relationship between estrogen treatment and nitric oxide. **Methods** Forty-five SD rats, 10-month-old, were sham-operated (Sham) or surgically ovariectomized (OVX) or OVX + estrogen (Premarin) treated. The rats were sacrificed at 12 weeks post-surgery. *In situ* hybridization was used to detect the expression of iNOS mRNA, immunohistochemistry was used to study the expression of iNOS or eNOS, and image analysis was done to measure the gray scale and average integral optical density (ODI). **Results** In the OVX group, the expression of iNOS mRNA and the synthesis of iNOS significantly increased, compared to that in Sham group ($P < 0.01$). In the premarin group, the expression of iNOS was significantly decreased. There was no significant difference in the expression of eNOS between OVX group and Sham group, but the expression of eNOS significantly increased in the Premarin group ($P < 0.05$). **Conclusion** Nitric oxide (NO) induction by nitric oxide synthase (NOS) is not only a physiological mediator, but also a pathologic factor; it plays an important role in the process of osteoporosis. Decreased expression of estrogen and increased expression of proinflammatory cytokines will stimulate bone resorption by induction of NOS to generate NO. Estrogen can protect the osteoporotic rats from bone loss by NOS ways, facilitating the coupling of bone formation and resorption.

【Key words】 Osteoporosis; Nitric oxide; Nitric oxide synthase; Estrogen

基金项目:广东省中医药管理局资助项目(099613)

作者单位:518033 广东,深圳市中医院(李昂、卿茂盛);北京积水潭医院(薛延)

一氧化氮(nitric oxide, NO)是细胞间、细胞内的信使分子,其扩散速度、穿透细胞膜的能力、内在不稳定性等特征极为显著。由于其合成易于调节,作为高级生物体调节的有效信号在循环、呼吸、消化及

内分泌代谢等系统中发挥着重要影响。近年来发现 NO 及其一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)在参与和促进骨质疏松症(osteoporosis, OP)病理生理过程中也占有举足轻重的作用, NO 导致细胞因子诱导性骨吸收增强与绝经后雌激素缺乏妇女 OP 密切相关。

材料和方法

1. 实验动物: 健康 10 月龄 SD 雌性大鼠, 体重 (289.71 ± 23.6) g, 广东省实验动物中心提供。给标准饲料, 自由饮水, 随机选取 60 只行双侧卵巢切除, 1% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔麻醉, 无菌条件下取腰椎两侧切口进入腹腔背侧, 完整摘除双侧卵巢, 假手术组仅切除腹腔内小段肠系膜, 止血缝合。成功的卵巢切除在卵巢切除后 5 d 连续阴道涂片无周期性变化, 尸检时子宫明显萎缩。

2. 实验方法: 大鼠摘除双侧卵巢后随机分为 3 组, 每组 15 只, 均用 1% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔麻醉, 经双侧腹部小切口暴露双侧卵巢。分组为: ①假手术组(Sham 组); ②卵巢切除组(OVX 组); ③OVX + 倍美力治疗组(Premarin 组)摘除双侧卵巢后, 倍美力(Wyeth-lederle 中国有限公司生产)0.125 mg/kg 灌胃, 每日 1 次。

3. 实验取材: 各组大鼠 90 d 后处死, 无 RNA 酶条件下, 取第 2, 3, 4 腰椎椎体, 剥离周围软组织, 抽去脊髓, 去除椎弓根。4% 多聚甲醛 0.1 mol/L PBS (pH7.4, 含 1% DEPC)液中固定 2~3 h, 常规脱水、透明、浸蜡、包埋、连续切片 5~7 μ m。

4. 主要试剂: iNOS 原位杂交检测试剂盒(内含 iNOS 地高辛标记 cDNA 多相寡核苷酸探针杂交液, 杂交稳定液 A、B, 封闭液, 兔抗地高辛抗体, 生物素化山羊抗兔抗体), 链酶亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)试剂盒, DAB 显色试剂盒, AEC 显色试剂盒, 以上均购自博士德公司; DEPC: Sigma 公司; 兔抗大鼠 cNOS 抗体, 兔抗大鼠 iNOS 抗体(Santa Cruz 公司)。

5. 原位杂交: 石蜡切片放置涂有防脱片胶(APES)的载玻片上, 常规脱蜡, 3% H_2O_2 处理, 3% 柠檬酸稀释的胃蛋白酶消化, 加入 iNOS 寡核苷酸探针, 40℃湿盒中杂交过夜, 梯度 SSC 洗涤, 封闭, 滴加 I 抗、II 抗, PBS 洗涤, 避光显色, 苏木素复染。封片后显微镜下观察 mRNA 表达分布情况。以 PBS 代替探针作阴性对照。

6. 免疫组化: 常规脱蜡, 3% H_2O_2 处理, 滴加复

合消化液, 滴加封闭液, 加兔抗大鼠 I 抗(iNOS 或 eNOS), PBS 洗涤, 加生物素化山羊抗兔 II 抗, 滴加 SABC, PBS 洗涤, 避光显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片, 封片后显微镜下观察 mRNA 表达分布情况。以 PBS 代替探针作阴性对照。

7. 检测方法: 封片后采用 MetaMorph 图像分析软件 3.51 版本对阳性染色的细胞进行定量分析, 经图像冻结、光密度标定、图像分割、编辑, 测定其平均灰度值及平均积分光密度(ODI)作统计指标。SPSS10.0 软件作均值方差分析, 并作各组间 *t* 检验, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结 果

1. iNOS 原位杂交: 各组 OVX 大鼠 iNOS 原位杂交结果见表 1。Sham 组: 骨髓腔内可见有几处细胞胞浆红色阳性表达, 但表达面积小, 且散在分布, 其余细胞胞浆阴性, 复染为浅蓝色。OVX 组: 骨髓内呈团簇样红色颗粒的强阳性表达, 在骨小梁表面成骨细胞胞浆中均分布有大量红色 iNOS 阳性表达颗粒。Premarin 组: 红色阳性表达的骨髓基质细胞分布少且散在, 阳性杂交染色的面积量和强度呈下降趋势, 骨表面成骨细胞表达强度减少, 表明 iNOS 表达明显受到抑制。

表 1 iNOS 原位杂交结果($\bar{x} \pm s$)

组别	灰度值	积分光密度
Sham 组	174.07 ± 24.65	0.234 ± 0.038
OVX 组	$225.92 \pm 21.05^{\wedge\wedge}$	$0.391 \pm 0.030^{\wedge\wedge}$
Premarin 组	$204.80 \pm 34.51^{\wedge}$	$0.311 \pm 0.044^{\wedge\wedge**}$

注: 与 Sham 组相比, $^{\wedge} P < 0.05$, $^{\wedge\wedge} P < 0.01$; 与 OVX 组相比, $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$ (下表同)

2. iNOS 免疫组化: 各组 OVX 大鼠 iNOS 免疫组化结果见表 2。Sham 组: 骨小梁表面可见形状扁平的骨衬细胞(lining cell), 为成骨细胞完成成骨功能后, 覆盖并静止在骨表面上, 基本上胞浆为蓝色阴性表现, 有一些散在分布的阳性在髓腔中, 但表达量小, 表达强度低。OVX 组: 红色阳性颗粒散在分布或簇拥成团, 成骨细胞也有明显阳性信号, 骨吸收活动明显, 成骨活动在破骨性骨吸收刺激下有一定增强, 呈高转换型表现。Premarin 组: 骨髓腔内有 iNOS 表达, 但表达量较少, 强度较低, 胞浆内蓝色阴性成骨细胞占多数, 红色阳性表达成骨细胞为少数, 骨小梁表面成骨细胞基本未见表达, 表明 iNOS 合成明显受到抑制。

表 2 iNOS 免疫组化结果($\bar{x} \pm s$)

组别	灰度值	积分光密度
Sham 组	164.93 $\pm$ 14.52	0.405 $\pm$ 0.038
OVX 组	196.02 $\pm$ 9.39 $^{\Delta\Delta}$	0.524 $\pm$ 0.059 $^{\Delta\Delta}$
Premarin 组	172.61 $\pm$ 14.82 $^{\Delta\Delta*}$	0.457 $\pm$ 0.044 $^{\Delta\Delta*}$

3. eNOS 免疫组化: 各组 OVX 大鼠 eNOS 免疫组化结果见表 3。Sham 组: 骨髓基质细胞均可见有散在分布的 eNOS, 表达量较低, 骨小梁表面的成骨细胞未见有明显表达。OVX 组: 骨髓基质细胞可见有 eNOS 阳性表达, 阳性表达细胞胞浆可见染色为棕黄色, 细胞核复染为蓝色。同时骨小梁稀疏, 髓腔相对扩大, 骨质较薄, 表面粗糙不平。Premarin 组: eNOS 表达强度和表达面积增加, 骨髓腔内及骨表面成骨细胞可见有明显 eNOS 分布, 有较多棕黄色颗粒分布在细胞胞浆中, 骨髓腔内细胞增生及向成骨细胞分化明显, 骨小梁表面细胞为立方形、圆形、柱状, 表明有较旺盛的成骨活动。

表 3 eNOS 免疫组化结果($\bar{x} \pm s$)

组别	灰度值	积分光密度
Sham 组	169.65 $\pm$ 21.31	0.385 $\pm$ 0.058
OVX 组	160.72 $\pm$ 16.35	0.391 $\pm$ 0.057
Premarin 组	178.05 $\pm$ 8.61 *	0.513 $\pm$ 0.090 $^{\Delta\Delta*}$

讨 论

1. NO 对骨细胞的生理作用

NO 是由 NOS 催化 L-精氨酸脱胍基而产生的, 目前已证实骨组织中主要存在内皮细胞 NOS (endothelial NOS, eNOS 或 NOS3) 及诱生型 (Inducible NOS, iNOS 或 NOS2)^[1]。正常生理状态下, eNOS 产生低浓度的 NO (pmol 级), 具有生理性作用。iNOS 为非 Ca^{2+} 依赖性, 在细胞因子、脂多糖等刺激诱导下, iNOS 将被大量诱导产生 (来源于骨髓巨噬细胞、成骨细胞、破骨细胞等), 活性可持续达 20 h, 合成纳摩尔-微摩尔 (nanomole - micromolar) 水平的 NO, 比 eNOS 合成的 NO 浓度高的多, 体内高出生理浓度的 NO 一般都是 iNOS 被活化的结果^[2]。

细胞因子在骨代谢过程中的变化与 OP 产生密切相关, OP 或雌激素缺乏患者其外周血及骨组织中细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 释放水平较同年龄组正常人群升高, 并随年龄增加有逐步上升趋势^[3]; Kasten^[4]证实 iNOS 产生的 NO 对体内破骨细胞 (OC) 骨降解活性起重要作用, 去卵巢大鼠 (OVX) IL-1 β 、TNF- α 也将增加, 体内细胞因子水平发生改变后将造成 NO 浓度的升高, 增强了 OC 骨吸收活性, 从而

成为 OP 病理生理过程中重要因素。

成骨细胞 (OB) 同时存在 eNOS 及 iNOS mRNA 表达^[5]。OB 的增殖及其骨基质分泌功能的正常发挥依赖于适当浓度 NO 存在, 正常生理情况下, eNOS 所生成的低浓度 NO 在维持 OB 正常功能及介导雌激素防止骨丢失中发挥重要作用。但过高浓度 NO 也将产生毒性, 抑制 OB 的成熟、分化及其功能, 如 TNF- α 、IL-1 β 和 IFN- γ 联合作用于体外培养人 OB 可显著抑制其对 ^3H -胸腺嘧啶 (^3H -TdR) 的摄入, 使该培养基中 OB 增殖不如对照组的 10%, 并抑制 OB 前体增殖, 影响 OB 生成, 促进成熟 OB 凋亡^[6]。

雌激素缺乏状态下, 骨髓单核细胞分泌 IL-1 和间质细胞分泌 IL-6 都增多^[7], 造成骨吸收亢进。如 Pacifici^[8]发现绝经后骨质疏松患者 IL-1 的浓度明显高于对照组, 用雌激素治疗后, 亢进的 IL-1 可降低到对照组水平。Gowen 等^[9]发现, 卵巢切除组 TNF- α 的产生增多, 加用雌激素补充治疗组 TNF- α 恢复到正常水平。过去, 对 OP 患者应用雌激素治疗后发现其心血管疾病发病率也随之降低, 现已证实雌激素对心血管保护作用是由雌激素诱导内皮细胞释放 NO 所引起。雌激素经证实可升高体外培养人 OB 及内皮细胞的 eNOS 基因表达及其活性, 在实验中, 雌激素可增强 NOS 活性 2 倍以上, 并证实主要是通过 eNOS 通路^[10]。

2. 骨质疏松发生一氧化氮机制及雌激素调控作用

本实验大鼠 iNOS 原位杂交、iNOS 免疫组化实验结果显示: OVX 大鼠不仅在骨髓内呈团簇样的强阳性表达, 在骨表面活跃成骨细胞胞浆中也有阳性表达, 表明正常大鼠去卵巢后, iNOS 表达及合成明显升高 (灰度值及积分光密度与 Sham 组比, $P < 0.01$), 升高的致炎细胞因子在 TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 等作用下, iNOS 的表达增加, 可明显刺激 OC 的骨吸收活性, 从而造成骨吸收大于骨形成, BMD 下降。OVX 大鼠属于高转化型骨质疏松动物模型, 在 OC 骨吸收时, 骨基质钙释放, 形成局部高钙环境, 刺激 OC iNOS 高水平表达, 则可合成过高浓度的 NO, 而 NOS 和 NO 对 OC 功能呈双向性调节, 高浓度的 NO 将反馈性的抑制骨吸收, 由于 OB 对高浓度 NO 的耐受性高于 OC, 故可相对地更多抑制 OC 骨吸收活性, 这也可能是 OC 骨吸收的反馈性调节方式之一。

骨代谢过程中, 在雌激素水平降低的情况下, TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-6 等细胞因子促进骨吸收, 骨代谢转换亢进, 但骨吸收超过骨形成, 从而导

致骨量减少;此时补充雌激素,骨量减少明显受到抑制。本实验结果显示:应用雌激素后,Premarin 组红色 iNOS 阳性表达颗粒散在分布在髓腔中,骨表面骨细胞表达强度也相应减少,灰度值及积分光密度值降低,表明 NO 生成明显受到抑制,OC 骨吸收活动减弱,这与雌激素抑制卵巢切除后的致炎细胞因子产生有关,从而减少了骨髓腔及骨小梁表面 iNOS 表达,降低了骨内微环境升高的 NO 浓度,减少了亢进的 OC 骨吸收活动,从而使骨量减少受到抑制。

适度的 NO 浓度,是骨细胞系正常生理活动发挥所必须的,而在正常生理情况下,NO 的生成主要来自于 eNOS 合成,而非炎性细胞因子刺激下 iNOS 的升高^[11]。大鼠骨组织切片 eNOS 免疫组化试验结果显示,正常情况下,骨组织中均可见有散在分布的 eNOS,卵巢切除后,eNOS 生成未见有明显改变($P > 0.05$),Premarin 组 eNOS 表达强度和表达面积则明显增加,骨髓腔内可见明显 eNOS 分布,骨小梁表面成骨细胞也有棕黄色颗粒分布在细胞胞浆中,灰度值及积分光密度与 OVX 组比较明显上升($P < 0.05$),骨髓腔内细胞增生及向成骨细胞分化明显,骨小梁表面细胞为立方形、圆形、柱状,表明有较旺盛的成骨活动,这与以往雌激素促进细胞内 eNOS 表达的研究发现相符合^[10]。与炎性细胞因子刺激 iNOS 表达生成大量 NO 不同,eNOS 生成 NO 浓度较低,且 eNOS 表达与合成过程可较好地受机体调控,故可认为 eNOS 生成 NO,主要与促进骨细胞系维持正常生理活动相关,而非 iNOS 诱导生成较多 NO 后而明显刺激 OC 骨吸收活动。

3. 小结

(1)OVX 大鼠原位杂交、免疫组化实验显示 NO 是调节 OB、OC 功能活动的一种重要效应因子,雌激素生成减少,细胞因子水平发生改变后造成 NO 浓度升高,增强了 OC 骨吸收活性,从而成为 OP 病理过程中重要环节。Premarin 对 iNOS mRNA 表达有明显的下调作用,抑制 iNOS 蛋白合成,提示 Premarin 可从 mRNA 转录水平调控 NOS 的活性,从而减轻功能亢进的 OC 性骨吸收,而对骨组织正常生理活动中的 eNOS 合成,有适度促进作用,有利于骨组织的重建及骨量的恢复,从而重建骨形成-吸收新平衡偶联。

(2)本实验也表明:NO 导致细胞因子诱导性骨

吸收增强与绝经后雌激素缺乏 OP 密切相关,骨质疏松的一氧化氮机制及雌激素防治骨质疏松的一氧化氮通路在骨质疏松症生理、病理过程中发挥着重要影响。

(3)在活体,NO 作为一种细胞因子诱导的骨代谢调节剂提供了一个可能性,即用 NO 合成抑制剂或刺激剂来影响骨转化。目前,一些研究认为调控 NO 药物将可能成为具有广阔前景的 OP 治疗药物^[12,13]。

参 考 文 献

- 1 Miep H, Helfrich, Deborah, et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 1108-1112.
- 2 Robert J, De Marco G, Gangula P, et al. Cytokine induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 1797-1801.
- 3 Zheng SX, Vrindts Y, Lopez M, et al. Increase in cytokine production (IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha but not IFN-gamma, GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis. *Maturitas*, 1997, 26: 63-71.
- 4 Kasten TP, Collin Osdoby P, Patel N, et al. Potentiation of osteoclast bone resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 3569-3573.
- 5 MacPherson H, Noble BS, Ralston SH, et al. Expression and functional role of nitric oxide synthase isoforms in human osteoblast-like cells. *Bone*, 1999, 24: 179-185.
- 6 Damoulis PD, Hauschka PV. Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 412-422.
- 7 薛延. 骨质疏松症诊断与治疗指南. 北京: 科学出版社, 1999. 35-45.
- 8 Pacifici R. Is there a causal role of IL-1 in postmenopausal bone loss? *Calcif Tissue Int*, 1992, 50: 295-299.
- 9 Ralston SH, Russel RGG, Gowen M. Estrogen inhibits release of tumor necrosis factor from peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*, 1990, 5: 983-986.
- 10 Gray TK, Flynn TC, Gray KM, et al. 17 beta-estradiol acts directly on the clonal osteoblastic cell line UMR 106. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 6267-6271.
- 11 RJ van't Hof, Ralston SH, Johnston PW, et al. Nitric oxide's function in bone cells. *Curr Opin Orthop*, 1997, 8: 19-24.
- 12 李昂, 萧劲夫, 薛延. 骨质疏松与一氧化氮. *中国病理生理杂志*, 2001, 17: 174-179.
- 13 Zofkova I, Kaneva RL. New drugs with positive effects on bones. *Cas Lek Cesk*, 1997, 136: 459-463.

(收稿日期: 2002-07-26)