

# 去势大鼠血清 ALP 动态及骨髓细胞骨形成相关基因表达研究

于志锋 顾淑珠 高建军 周轶 金慰芳

**【摘要】** 目的 了解雌性大鼠切卵去势后血清碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)变化规律及骨髓细胞的骨形成相关基因 ALP、骨钙素(Bone Gla-containing protein, BGP)及核结合因子  $\alpha 1$ (core binding factor 1, Cbf  $\alpha 1$ ) 的 mRNA 表达。方法 6 月龄 SD 雌性大鼠 18 只, 随机分为假切卵(Sham)和切卵(OVX)组。其中每组 5 只大鼠于术后起每隔 10 d 断尾采血一次至 90 d, 用对-硝基苯磷酸盐(P-NPP)法测量血清 ALP; 每组 4 只大鼠于术后 10 d 处死获取骨标本, 用 RT-PCR 方法检测骨髓细胞中 ALP、BGP、Cbf $\alpha 1$  mRNA 表达改变。结果 OVX 组大鼠血清 ALP 水平, 10 d 时已较 Sham 组显著升高( $P < 0.05$ , +40.0%), 20 d 时升高呈峰值( $P < 0.05$ , +63.6%), 30 d 时则显著性降低( $P < 0.05$ , -26.1%), 40 d 起呈回升, 与 Sham 组比较 40、50、60、70、80 及 90 d 时的 ALP 分别增加 26.2% ( $P < 0.05$ )、18.1%、16.9%、68.5% ( $P < 0.05$ )、42.6% ( $P < 0.05$ ) 与 45.9% ( $P < 0.05$ ); 切卵后 10 d 骨髓细胞中 ALP、BGP、Cbf $\alpha 1$  mRNA 的表达 OVX 组明显高于 Sham 对照组( $P < 0.05$ )。结论 大鼠去势后早期血清 ALP 呈先增高后下降的波动性变化, 以后回升呈不同程度增高; 骨髓细胞的 ALP、BGP 和 Cbf  $\alpha 1$  mRNA 表达呈增高改变。

**【关键词】** 去势大鼠; 碱性磷酸酶; 骨形成; 相关基因

**Changes of serum alkaline phosphatase levels and expressions of osteogenesis-related genes in bone marrow cells of ovariectomized rats** YU Zhifeng, GU Shuzhu, GAO Jianjun, et al. Department of Bone Metabolism, Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China

**【Abstract】 Objective** To study the changes of osteogenesis-related genes in marrow cells of ovariectomized rats in serum alkaline phosphatase and mRNA expressions. **Methods** Eighteen 6-month old rats are divided randomly into 2 groups: ovariectomized group and sham operated control group. Five rats' blood was obtained via their tails in each group every 10 days after operation till 90th day, and serum ALP was determined by the PNPP method. Four rats in each group were killed and their bone samples were obtained 10 days after operation. Then the mRNA expressions of ALP, BGP and CBFA1 in bone marrow cells were detected by RT-PCR. **Results** The serum ALP levels in ovariectomized group at 10 days were significantly higher than those in the sham group ( $P < 0.05$ , +40.0%) and reached the peak at 20 days ( $P < 0.05$ , +63.6%), Then significantly lowered at 30 days ( $P < 0.05$ , -26.1%), and rose to present level at 40 days. At 40, 50, 60, 70, 80 and 90 days, the ALP levels in OVX group were higher than those in sham group by 26.2% ( $P < 0.05$ ), 18.1%, 16.9%, 22.5% ( $P < 0.05$ ), 42.6% ( $P < 0.05$ ) and 45.9% ( $P < 0.05$ ), respectively. Ten days after operation, the mRNA expression of relevant genes in ovariectomized group were significantly higher than those in the sham group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Rise-fall fluctuations in serum ALP levels are observed in OVX rats in the early stage after ovariectomy. The expressions of ALP, BGP and Cbf $\alpha 1$  in OVX group are higher than those in the control group.

**【Key words】** Ovariectomized rats; ALP; BGP; Cbf  $\alpha 1$

切卵去势骨质疏松大鼠模型为广大研究者较为认同的模拟绝经后骨质疏松症(OP)的动物模型,

被广泛应用于 OP 机理及药效学等研究。ALP 作为反映骨形成功能的主要生化指标亦被广泛应用于临床诊断及药效研究。一般认为, 切卵或绝经以后骨代谢处于高转换状态, 即骨吸收与骨形成均十分活跃, 血 ALP 处于高水平, 但也有不一致的报道。本实

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170439)

作者单位: 200032 上海, 复旦大学放射医学研究所骨代谢研究

实验将观察大鼠切卵术后血 ALP 水平的动态变化规律及骨髓细胞中骨形成相关基因 ALP、BGP、Cbf  $\alpha 1$  mRNA 表达的改变,旨在为骨质疏松药效及作用机理研究的观察时相及指标选择提供一定的参考依据。

材料和方法

1. 动物与分组

6月龄SD雌性大鼠18只(复旦大学实验动物部提供)。体重(250 ± 20)g,随机分为两组,每组9只,氯胺酮麻醉下行假切卵或切卵术,术后常规饲养。

2. 试剂和仪器

对硝基苯磷酸二钠盐(4-Nitrophenyl phosphate Disodium Salt PNPP);二乙醇胺(Diethanolamine DEA);对硝基苯酚(PNP);Medium 199培养基(GIBCO美国);TRIzol为BioBasic公司,AMV为Promega公司,焦碳酸二乙酯(Diethyl Pyrocarbonate, DEPC)和溴化乙锭(Ethidium Bromide, EB)购自华舜生物工程公司;PCR PreMixkits购自赛百盛生物工程公司;ELx800酶标仪;Biometra PCR仪,Tanon GIS凝胶成像分析系统。

3. 血清 ALP 测量

每组5只大鼠,于切卵手术后每隔10d断尾采血1次,分离血清,-20℃保存,待90d(共9次)样品收集完毕后,一次性用PNPP法进行酶反应<sup>[1]</sup>、酶标仪A405nm处测试ALP活性(以U/L表示),并以均数绘制动态变化曲线。

4. 骨形成相关基因表达测试

(1)总RNA提取

每组4只大鼠于切卵后第10d以乌拉坦腹腔麻醉后颈动脉放血处死,无菌取下第1~3腰椎(L<sub>1-3</sub>),将椎体置于2ml培养液(Medium 199培养液,含青霉素100U/ml、硫酸链霉素100μg/ml、10%小牛血清、5%胎牛血清)中快速(含骨髓)刮碎,漩涡混合器水平混悬5s × 2次,取上层骨髓细胞悬液,冰浴中备用。取上述细胞悬液0.5ml/管,低渗破除红细胞后,Trizol一步法提取总RNA。RNA溶解于DEPC水,-70℃保存。

(2)逆转录反应

在200μl反应管(冰浴)中加入RNA2μl(约1μg),Oligo(dT12-18)0.5μg,Rnasin0.5μl,5 × RT-buffer5μl, dNTPs 0.5μl,AMV1μl,补加DEPC水至总体积25μl。瞬时离心,PCR仪上进行逆转录反应,反应条件:37℃ 60min;94℃ 4min。

(3)PCR反应

按照kit操作。在冰浴PCR管(已包含Taq DNA酶1unit,10 × buffer 2μl, dNTPs各200μM,PCR enhancer 2mM,上样染料和稳定剂2μl)加cDNA2μl,上游引物2μl,下游引物2μl,补加DEPC水至总体积20μl,混匀,瞬时离心,在PCR仪上反应,反应条件见表1、2。

表1 PCR引物序列

基因	上游引物	下游引物	产物 (bp)
ALP	5' gca caa cat caa gga cat cg 3'	5' agg gaa ggg tca gtc agg tt 3'	300
BGP	5' gag gac cct ctc tct gct ca 3'	5' agg gaa ggg tca gtc agg tt 3'	400
CBFA1	5' ccg atg gga cag tgg tta 3'	5' gcg ccc taa atc act gag g 3'	308
GAPDH	5' cgt gga gtc tac tgg cgt ct 3'	5' tcc tca gtg tag ccc agg at 3'	553

表2 PCR反应条件

基因	反应条件
ALP	94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 30s, 32循环
BGP	94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 30s, 32循环
CBFA1	94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 30s, 32循环
GAPDH	94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 30s, 30循环

(4)PCR产物凝胶电泳分析

PCR产物7μl直接上样,在2%琼脂糖凝胶(含EB0.5μg/ml)中电泳,DNA分子量marker作参照。电泳条件:70V 45min。电泳条带在紫外投射仪(340nm)下观察,Tanon GIS凝胶成像分析系统摄像,读取光密度值,并求出与内参照基因GAPDH的光密度比值。

5. 统计学处理:所有数据输入Excel表,应用SPSS11.0统计软件对实验组与对照组的差异进行t检验,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。

结果

1. 大鼠去势后血清ALP变化

结果显示手术10d后OVX组的ALP水平明显高于Sham组(P < 0.05; +40.0%);20d时呈现峰值(P < 0.05; +63.6%),30d时下降呈现谷值,与Sham组比较差异具有显著性(P > 0.05; -26.1%),40d起OVX组的ALP水平呈回升趋势,与Sham组比较40、50、60、70、80及90d时分别增加26.2%(P < 0.05)、18.1%、16.9%、68.5%(P < 0.05)、42.6%(P < 0.05)与45.9%(P < 0.05),见表3。动态变化曲线见图1。

表3 血清碱性磷酸酶测量结果(U/L)(n=5)

术后天数 (d)	Sham	OVX	与 Sham 组比较 (±%)
10	133.54 ± 27.80	186.98 ± 37.41*	+ 40.0
20	137.69 ± 15.21	225.27 ± 46.44*	+ 63.6
30	127.65 ± 13.50	94.30 ± 11.56*	-26.1
40	129.10 ± 14.06	162.96 ± 19.92*	+ 26.2
50	111.59 ± 16.38	131.83 ± 29.01	+ 18.1
60	135.17 ± 35.98	158.08 ± 37.48*	+ 16.9
70	92.65 ± 7.61	156.14 ± 49.15*	+ 68.5
80	119.76 ± 19.77	170.72 ± 31.31*	+ 42.6
90	82.13 ± 18.80	119.82 ± 11.37*	+ 45.9

注:与同时相切卵组比较 \* P < 0.05

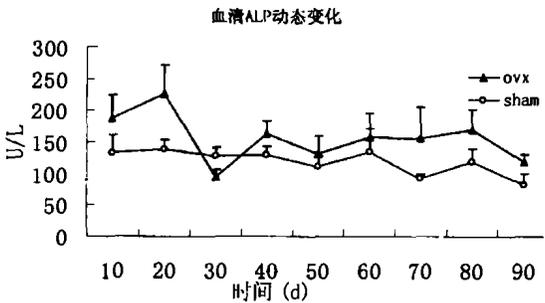


图1 大鼠切卵后血清 ALP 动态变化

2. 骨髓细胞骨形成相关基因表达变化

RT-PCR 半定量分析结果表明,大鼠切卵 10 d 后,骨髓细胞中 ALP、BGP 及 Cbfa1 mRNA 表达显著增加,与 Sham 组比较分别增高 113% (P < 0.05)、75% (P < 0.05)与 94% (P < 0.05),见表 4。

表4 大鼠切卵后 10 d 骨髓细胞骨形成相关基因表达

组别	ALP/GAPDH	BGP/GAPDH	CBFA1/GAPDH
Sham	0.45 ± 0.08*	0.40 ± 0.07*	0.49 ± 0.08*
OVX	0.96 ± 0.02 (+ 113%)	0.70 ± 0.20 (+ 75%)	0.95 ± 0.03 (+ 94%)

注:与切卵组比较 \* P < 0.05

讨 论

ALP 测定是骨代谢性疾病常用的生化指标之一,主要反映骨形成功能状态。血清中 50% 左右的 ALP 来自于骨,另外主要来自肝脏。在影响肝功能因素较小的动物实验中,血清总 ALP 可比较确切地反映骨形成功能状态。骨的 ALP 主要由成骨细胞合成、释放入血,在骨形成增加时血清 ALP 升高。卵巢摘除后的骨代谢处于高转换状态,即骨吸收与骨形成均增加,因此,血 ALP 常处于高水平。本研究以 10 d 为一时相点,观察大鼠卵巢切除后 90 d 之间的血 ALP 变化,结果显示,切卵早期血 ALP 呈较大幅度

的波动性变化,表现为先升、后降、再加升并保持较平稳的高水平状态。引起大幅波动可能为成骨细胞对卵巢摘除后体内雌激素快速撤退的应急性反应,以往关于切卵后血 ALP 水平的不一致报道可能与观察时间正处在下降时段有关。至于大鼠切卵后血 ALP 水平升高的持续时间尚待进一步观察。

成骨细胞来源于骨髓基质细胞。体外培养的骨髓基质细胞经地塞米松等诱导可分化为 ALP 高表达的成骨细胞。ALP 与 BGP 是成骨细胞分泌的特异性蛋白,前者能水解有机磷酸盐为无机磷酸盐,加速钙盐沉积<sup>[2]</sup>,后者对于细胞外基质蛋白的形成以及骨组织的矿化过程具有主要调节作用<sup>[3]</sup>,二者的分泌将直接影响骨基质的形成与矿化,而它们的 mRNA 水平表达将直接影响蛋白水平的变化。CBFa1 是成骨细胞的特异性转录因子,它是在骨钙素基因的启动发现的,可以调节骨钙素的表达,是一种上游调控基因<sup>[4]</sup>,本研究中,去势大鼠的 CBFa1 基因的表达量较对照组有明显的升高,同时 ALP 与 BGP 的表达量也呈平行升高,说明二者表达的改变与 CBFa1 的表达改变有关。在胚胎发育过程中,所有主要生长因子家族的成员都参与成骨细胞分化的调控。在体外很多骨形态蛋白(BMPs)都能诱导 Cbfa1 的表达。这种作用似乎是间接性的,因为至今尚未发现他们的生理相关性<sup>[5]</sup>。总之,本研究表明,去势大鼠血清 ALP 升高,这种升高可能与骨髓细胞基因表达水平的改变有关,特别是上游调控序列 CBFa1 的表达升高有关。

参 考 文 献

- Miggiano GAD, Mordente A, Pischiutta MG, et al. Early con-formational changes and activity modulation induced by guanidinium chloride on intestinal alkaline phosphatase. *Biochem J*, 1987, 248: 551.
- Stucki U, Schmid J, Hammerle C.F. & Lang, N.P. Temporal and local appearance of alkaline phosphatase activity in early stages of guided bone regeneration. *Clinical Oral Implants Research*, 2001, 12: 121.
- Beerteen W, et al. Alkaline phosphatase induces the mineralization of sheets of collagen implanted subcutaneously in the rat. *J Clin Invest*, 1992, 89: 1974.
- Ducy P, Karsenty G. Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol Cell Biol*, 1995, 15: 1858.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 1997, 89: 747.

(收稿日期:2003-11-01)