

大鼠骨髓细胞 PPAR γ 和 Cbf α 1mRNA 表达的增龄变化及相关性研究

丰盛梅 金慰芳 高建军 顾淑珠

摘要: 目的 观察大鼠骨髓细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 与核结合因子 α 1 (core binding factor α 1, Cbf α 1) 表达的增龄性变化, 分析二者变化的相关性, 探讨老年性骨衰退发生的可能分子机制。方法 取 1、3、7、12、16、18 和 20 月龄的 SD 大鼠, 每组雌雄各 5 只, 无菌获得腰椎骨髓细胞, 用 RT-PCR 方法检测骨髓细胞中 PPAR γ 与 Cbf α 1mRNA 的表达水平; 并采用 SPSS11.0 统计软件进行差异单因素方差分析和相关性分析。结果 PPAR γ mRNA 的表达水平在 3 月龄前变化不大, 7 月龄时下降, 约为 3 月龄的 34% ($P < 0.01$), 之后逐渐上调, 18 月龄约为 7 月龄的 8.8 倍 ($P < 0.001$); Cbf α 1 mRNA 表达水平在 3 月龄为最高, 为 1 月龄的 3 倍 ($P < 0.001$), 随后逐渐下调, 18 月龄为最低, 约为 3 月龄的 6% ($P < 0.001$)。PPAR γ 与 Cbf α 1mRNA 的表达水平从 3 月龄开始呈负相关 ($r = -0.5967$, $P < 0.01$), 相关系数随月龄增加而增加, 16~20 月龄期间二者变化的相关性最大。结论 PPAR γ mRNA 在老年大鼠骨髓细胞中高表达, 且与 Cbf α 1mRNA 的表达呈负相关, 提示骨髓细胞 PPAR γ 高表达可能参与老年性成骨细胞前体减少和骨衰退的过程。

关键词: 大鼠; 骨髓细胞; PPAR γ ; Cbf α 1; 增龄; 相关性;

Expression of PPAR γ and Cbf α 1 mRNA in bone marrow cells of rat and their correlation with aging
FENG Shengmei, JIN Weifang, GAO Jianjun, et al. Department of Bone Metabolism, Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: Objective To investigate the change of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and core binding factor α 1 (Cbf α 1) genes expression and their correlation in bone marrow cells (BMCs) with aging and the possible molecular mechanism in senile bone diminution. **Methods** Totally 70 SD rats were divided into 7 different age groups: 1, 3, 7, 12, 16, 18 and 20 month-old group. Each group contained 5 male and 5 female rats. The BMCs were collected from lumbar vertebra (L₄₋₅). The expression of PPAR γ and Cbf α 1 mRNA in BMCs were analysed by semi-quantity RT-PCR. **Results** The mRNA expression of PPAR γ was stable before 3 months old. But it decreased to 34% of the expression of 3 months old at 7 months ($P < 0.01$) and reached the highest level at 18 months old (8.8 times of that of 7 months, $P < 0.001$). The expression of Cbf α 1 mRNA showed the peak value at 3 months old which was 3 times of that of 1 month ($P < 0.001$) and down-regulated after 3 months and achieved the lowest level at 18 months old (6% of that of 3 months old, $P < 0.001$). The PPAR γ mRNA level showed a negative correlation to Cbf α 1 after 3 months old ($r = -0.5967$, $P < 0.01$). The correlation became stronger with aging and had the strongest relationship during 16~20 months old ($r = -0.93$, $P < 0.01$) during the period of 16 to 20 months old. **Conclusion** The reduction of osteoblastic progenitors and bone diminution in old population maybe partly due to high expression of in PPAR γ BMCs.

Key words: Rat; Bone marrow cells; PPAR γ ; Cbf α 1; Aging; Correlation

骨髓中成骨细胞前体 (Osteoblastic progenitors) 缺乏是增龄性骨量丢失发生的机制之一。高

龄人群骨髓中成骨前体细胞减少的同时常伴随脂肪细胞数量的增加^[1], 其机制尚未十分明确。成骨细胞和脂肪细胞都来源于骨髓间充质干细胞。PPAR γ 和 Cbf α 1 分别是骨髓间充质干细胞向脂肪细胞和成骨细胞分化的关键转录因子。研究增龄过程中

PPAR γ 和 Cbfa 1 在骨髓细胞中的变化及相关性对认识高龄人群成骨细胞前体减少机制和探索骨质疏松干预新手段具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物

1、3、7、12、16、18 和 20 月龄 SD 大鼠，每组雌雄各 5 只。由复旦大学实验动物部提供。

1.2 主要设备及试剂

Biometra PCR 仪 (美国); Tanon GIS-700D 数码凝胶图像处理系统 (中国); Medium 199 培养基 (GIBCO 美国); TRIzol 试剂、焦磷酸二乙酯 (Diethyl Pyrocarborate DEPC)、AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒和即用型 PCR 扩增试剂盒、DNA 分子量 Marker (上海生工生物工程技术有限公司); 溴化乙锭 (Ethidium Bromide EB) (华舜生物工程公司)。

1.3 总 RNA 提取

实验大鼠用 22% 乌拉坦麻醉后颈动脉放血处死，无菌下分离腰椎椎体 (L₁₋₄，置 2ml 培养液 (Medium 199 培养液，含青霉素 100U/ml、硫酸链霉素 100 μ g/ml、10% 小牛血清、5% 胎牛血清) 中快速剪碎，漩涡混合器水平混悬 10s，取上层细胞悬液 (0.5ml/管)，低渗破红后 TRIzol 一步法提取总 RNA。RNA 溶解于 DEPC 水，-70 $^{\circ}$ C 保存。鉴定 RNA 的纯度及完整性 (调整浓度为 1 μ g/ μ l)。

1.4 骨髓细胞基因表达的检测

RNA 逆转录反应 (条件)，反应体系总体积为 20 μ l，产物 cDNA -20 $^{\circ}$ C 保存备用。PPAR γ 和 Cbfa1 的 PCR 引物序列如下：PPAR γ 上游：5'-ATG GTT GAC ACAG AGAT GCCA-3'，下游 5'-GAATAATAAGGCGGGGACG-3' (339bp)；Cbfa1 上游：5'-CGCACTCACTTGAAACAG-3'，下游 5'-TTCTACCACCTCCCTACTC-3' (308bp)；

内参基因 GAPDH 上游：5'-CGTGGAGTCTACT-GGCGTCT-3'，下游 5'-TCCTCAGTGTAGC-CCAGGAT-3' (553bp)。PCR 反应按 PCR 扩增试剂盒说明操作。95 $^{\circ}$ C 3min；94 $^{\circ}$ C 30s，55 $^{\circ}$ C (Cbfa 1、GAPDH) 和 52 $^{\circ}$ C (PPAR γ) 30s，72 $^{\circ}$ C 30s，分别为 32 (Cbfa 1)、30 (GAPDH) 和 35 (PPAR γ) 个循环，72 $^{\circ}$ C 5min，保存于 -4 $^{\circ}$ C。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，DNA 分子量 Marker 作参照。电泳条带在紫外投射仪 (340nm) 下观察，应用 Tanon GIS-700D 数码凝胶图像处理系统摄像，读取光密度值，并求出与内参照基因 GAPDH 光密度比值，以此比值半定量各基因 mRNA 的表达水平。

1.5 统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS11.0 统计软件进行差异单因素方差分析和相关分析。

2 结果

2.1 骨髓细胞 PPAR γ 与 Cbfa1 的 mRNA 表达

骨髓细胞 PPAR γ 与 Cbfa1 的 mRNA 表达见图 1。

2.2 PPAR γ 与 Cbfa1 mRNA 表达的增龄变化

表 1 与图 2 显示，PPAR γ mRNA 的表达在 3 月龄前变化不明显，7 月龄时下降，约为 3 月龄的 34% ($P < 0.01$)，之后逐渐上调，18 月龄时约为 7 月龄的 8.8 倍 ($P < 0.001$)；Cbfa1 mRNA 表达以 3 月龄最高，为 1 月龄的 3 倍 ($P < 0.001$)，随后逐渐下调，18 月龄仅为 3 月龄的 6% ($P < 0.001$)。

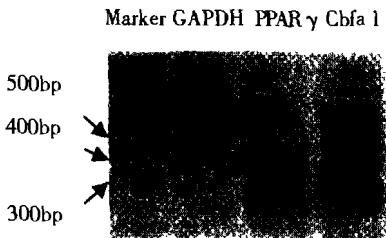


图 1 大鼠骨髓细胞 PPAR γ 和 Cbfa1 mRNA 的表达

表 1 不同月龄大鼠骨髓细胞 PPAR γ 和 Cbfa1 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

指标	1 月	3 月	7 月	12 月	16 月	18 月	20 月
PPAR γ	0.42 $\pm$ 0.09	0.62 $\pm$ 0.07	0.21 $\pm$ 0.04**	0.34 $\pm$ 0.05	0.79 $\pm$ 0.10**	1.84 $\pm$ 0.33***	0.17 $\pm$ 0.02***
Cbfa1	1.34 $\pm$ 0.16	4.19 $\pm$ 0.54***	2.81 $\pm$ 0.50**	2.60 $\pm$ 0.27**	1.79 $\pm$ 0.25**	0.25 $\pm$ 0.04***	0.57 $\pm$ 0.10

注：各组与上一组比较：* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

2.3 PPAR γ 和 Cbfa1 mRNA 表达的相关性分析

增龄过程中，大鼠腰椎骨髓细胞 PPAR γ 和 Cbfa1 mRNA 的表达水平从 3 月龄开始呈负相关 (r

$= 0.5967$ ， $P < 0.01$)，相关系数随月龄增加而增加，16~20 月龄期间两者变化的相关性最大 ($r = -0.9308$ ， $P < 0.001$)，见图 3。

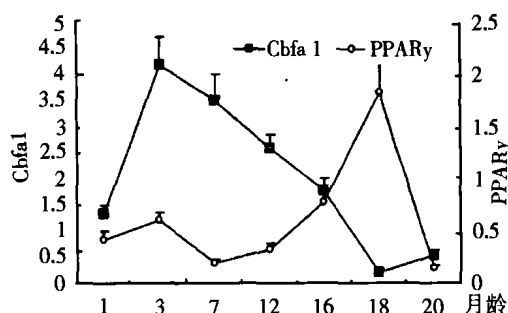


图2 骨髓细胞中 PPARγ 和 Cbfa1 mRNA 表达水平

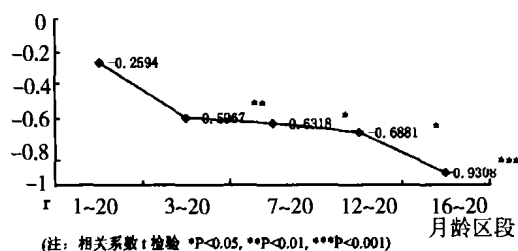


图3 PPARγ 和 Cbfa1 mRNA 表达水平相关系数变化趋势

3 讨论

成骨细胞骨形成能力下降是老年性骨质疏松发生的主要因素,其中成骨细胞数量的减少直接影响骨形成。体内成骨细胞主要由骨髓前体细胞分化而来,骨髓中成骨细胞前体的减少,导致成骨细胞群补充和更新减缓,是老年性骨衰退发生的细胞机制。成骨细胞和脂肪细胞来源于同一前体,即骨髓间充质干细胞。大量研究表明,成骨细胞和脂肪细胞在分化过程中可相互转化,临床也观察到年龄相关的骨质疏松骨量减少伴随有骨髓中脂肪组织的增加^[2-4]。因此,骨髓间充质干细胞向成骨细胞和脂肪细胞定向分化能力的变化是影响骨量的一个重要因素,也是近年来研究的热点。

PPARγ 是脂肪细胞分化过程中必需的关键转录因子,激活后可促使骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化,其表达水平反映脂肪细胞分化的活跃程度。有研究表明:PPARγ 在成纤维细胞中的过表达促使后者向脂肪细胞分化;PPARγ 缺陷的胚胎干细胞和胚胎成纤维细胞不能分化成脂肪细胞,而活化的 PPARγ 可促使骨髓间充质干细胞向脂肪细胞分化^[5,6],减少其向成骨细胞分化的比例,从而减少成骨细胞前体数量。因此认为 PPARγ 可能充当骨髓间充质干细胞向脂肪细胞和成骨细胞两个分化方

向之间的转换分子。本实验结果显示,增龄过程中骨髓细胞 PPARγ mRNA 表达的增加出现在 7 月龄以后,18 月龄为最显著,约为 7 月龄的 8.8 倍 ($P < 0.001$),表明骨髓基质细胞向脂肪细胞分化的增强,与老年性骨质疏松症常伴有骨髓中脂肪组织增加的现象相一致^[3]。

Cbfa1 是成骨细胞分化的关键性转录因子,在成骨细胞系及其前体细胞中特异表达,表达水平与间充质干细胞向成骨细胞分化的程度有关。Cbfa1 也可促进 I 型胶原、碱性磷酸酶、骨桥素等多个表型基因的表达^[7,8],反应成骨细胞分化的活跃程度。本研究结果显示:3 月龄大鼠骨髓细胞中 Cbfa1 mRNA 表达水平最高,是 1 月龄的 3 倍 ($P < 0.001$),表明该阶段骨髓细胞向成骨细胞分化加速以适应骨骼快速生长的需求。3 月龄后 Cbfa1 mRNA 表达逐渐下调,18 月龄时仅为 3 月龄的 6%,表明向成骨细胞分化程度减低,成骨细胞前体明显减少,与文献报道一致^[9],与大鼠骨量增龄性变化相一致^[10]。

骨髓中成骨细胞前体随增龄而减少的同时脂肪细胞不断增加^[4],鉴于 PPARγ 对骨髓间充质干细胞分化方向的调控作用,其与 Cbfa1 的相关性引起学者关注。Akune 等人^[11]采用 PPARγ 表达缺陷的动物和细胞研究表明,PPARγ 缺陷可增强骨形成、增加大鼠骨量,骨髓细胞中 Cbfa1、Ox (osterix)、LRP5 (LDL receptor-related protein 5) 等成骨细胞分化转录因子的表达均增高。骨髓基质细胞 PPARγ 2 高表达时可抑制 Cbfa1 和骨钙素 (osteocalcin) 基因的表达^[12]。本实验结果显示,增龄过程中骨髓基质细胞 PPARγ 和 Cbfa1 的 mRNA 表达水平变化从 3 月龄开始呈负相关 ($r = -0.5967$),且相关系数随月龄增加而增加,16~20 月龄期间二者变化的相关性最大。提示 PPARγ 在老年大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化抑制同时向脂肪细胞分化增强的过程中起一定作用;老年性成骨前体细胞减少可能部分与 PPARγ 高表达有关,后者可能是老年性骨衰退发生的细胞分子机制之一。

【参考文献】

- [1] Kajkenova O, Lecka-Czemik B, Gubrij I, et al. Increased adipogenesis and myelopoiesis in the bone marrow of SAMP6, a murine model of defective osteoblastogenesis and low turnover osteopenia. *J Bone Miner Res*, 1997, 12; 1772-1779.

(下转第 183 页)

DPD 水平与对照组之间差异有显著性, 并与 BMD 之间呈负相关, 且治疗前后二者水平变化差异也有显著性。这说明高骨吸收率伴随着高骨量丢失率, 而高骨量丢失率又使骨形成代偿性增加, 导致尿 DPD 排泄率及血 BAP 水平增加, 并经治疗好转时尿 DPD 排泄率及血 BAP 水平也相应减少。这在一定意义上提示 DPD/Cr、BAP 可以预测骨密度的改变。

在本研究中, 病人血 ALP 和 Ca、P 的水平与对照组相比及在治疗前后差异无显著性, 主要原因在于 Ca、P 在机体内有许多重要的生理功能, 其在正常情况下, 在神经体液的控制下, 只在很窄的范围内波动。Ca 的负平衡以每日 200~300mg 计算, 需 10 余年时间。故单次测定 Ca、P 的含量意义不大。ALP 来源于小肠、肝、肾、肺、骨等, 特异性不强。

本研究结果表明, 尿 DPD、血 BAP 能够动态反映骨代谢变化, 为骨质疏松症的诊断及其药物治疗的监测提供了重要的客观依据, 具有较好的临床意义。

【参 考 文 献】

- [1] 中国人骨质疏松症建议诊断标准 (第二稿). 中国骨质疏松杂志, 2000, 1 (6): 13.
- [2] Kazuhiro K, Mashida T, Kouichi K, et al. Comparison of markers for bone formation and resorption in premenopausal and postmenopausal subjects, and osteoporosis patients. J Clin Endoc Metab, 1995, 80: 2447-2450.
- [3] Thompson KM, Prestwood, DL, Kenny AM, et al. Low dose estrogen and calcium have an additive effect on bone resorption in older women. J Clin Endoc Metab, 1999, 84: 179-183.
- [4] Eyre DR, Dickson IR, Van Ness KP, et al. collagen cross-linking in human bone and articular cartilage: age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. Biochem J, 1988, 252: 459-500.
- [5] Uebelhart D, Gineyts E, Chapuy M. Urinary excretion of pyridinium cross-links: a new marker of bone resorption in metabolic bone disease. Bone Miner, 1990, 8: 87-96.
- [6] McLaren AM, Hodon LD, Bird HA, et al. Urinary excretion of pyridinium crosslinks of collagen in patients with osteoporosis and the effects of bone fracture. Ann Rheum Dis, 1992, 51: 648-651.