

雌激素对脂多糖诱导成骨细胞凋亡基因表达影响的实验研究

唐孝明 裴福兴 沈彬 王光林 刘仲前 王跃 庞健

摘要：目的 探讨雌激素对脂多糖诱导的体外培养大鼠成骨细胞凋亡基因 Bcl-2、Bax、Fas 表达的影响,为明确雌激素抑制脂多糖诱导的大鼠成骨细胞凋亡的机理提供依据。方法 新生 SD 大鼠颅骨第 2.3 代成骨细胞随机分为对照组、脂多糖组、脂多糖 + 雌激素组等 3 组,每组细胞分别培养 24、48、72 h,5、7、14 d 后作免疫组化染色,计数各组阳性细胞率,并比较组间的差异性。结果 对照组成骨细胞有少量 Bcl-2、Bax、Fas 表达,脂多糖组细胞 Bax 和 Fas 表达显著升高($P < 0.05$),高峰期为 72 h,Bcl-2 的表达无明显变化($P > 0.05$)。脂多糖 + 雌激素组细胞 Bax 和 Fas 表达显著降低($P < 0.05$),高峰期仍为 72 h,且 Bcl-2 的表达显著升高($P < 0.05$)。结论 脂多糖使成骨细胞 Bax 和 Fas 表达增强,而对 Bcl-2 的表达无明显影响,雌激素能抑制脂多糖增强成骨细胞 Bax 和 Fas 表达的作用,能使 Bcl-2 的表达明显增强,使 Bcl-2/Bax 比值增大从而抑制脂多糖诱导的大鼠成骨细胞凋亡。

关键词：雌激素；成骨细胞；细胞凋亡；基因

Experimental study of the effect of estrogen on expression of osteoblast apoptosis related genes induced by lipopolysaccharide TANG Xiaoming , PEI Fuxing , SHEN Bin , et al . Department of Orthopaedics , Sichuan Provincial Peoples Hospital , Chengdu 610072 , China

Abstract : Objective To find the mechanism of inhibitive effect of estrogen on the expression of osteoblast apoptosis related genes Bax , Bcl-2 and Fas induced by lipopolysaccharide . **Methods** Osteoblasts of second or third generation from new born SD rats calvaria were randomly divided into three groups , namely control group , lipopolysaccharide , lipopolysaccharide with estrogen group . Cells of each group were incubated for 24h , 48h , 72h , 5d , 7d , 14d , and then stained immunohistochemically . The rates of positive cells of each group were examined , and compared . **Results** Scarce positive expression of Bax , Bcl-2 and Fas was detected in the control group . The expression of Bax and Fas were significantly increased ($P < 0.05$) in lipopolysaccharide group with the peak value at 72h . The expression of Bcl-2 were not affected . The expression of Bax and Fas were significantly decreased ($P > 0.05$) in lipopolysaccharide and estrogen group with the peak value at 72h . **Conclusion** Lipopolysaccharide can increase the expression of Bax and Fas in osteoblast which can be inhibited by estrogen . While the estrogen increases the expression of Bcl-2-leading to the suppression of osteoblast apoptosis .

Key words : Estrogen ; Osteoblast ; Apoptosis ; Gene

雌激素对大鼠成骨细胞凋亡有抑制作用,但其作用机理尚不明确。目前已知调控成骨细胞凋亡的基因主要有 Bcl-2 基因家族、Fas 和 P 53 基因,李克强等^[1]在去卵巢大鼠骨质疏松模型的研究发现,成骨细胞凋亡的增加与 Bcl-2 的表达无关,而是因 Fas 的表达增强所致。本实验以体外培养的大鼠成骨细

胞为研究对象,以脂多糖诱导成骨细胞凋亡,探讨雌激素对凋亡调控基因 Bcl-2、Bax 和 Fas 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 成骨细胞的培养和鉴定

新生 SD 大鼠(3 ~ 5 d)消毒后处死,无菌取颅骨,置于含有 DMEM 的培养皿中,剔除骨内、外膜及骨缝间组织, Hank 液反复浸泡、洗涤 3 次,将骨块修整为 1 ~ 2 mm² 大小碎块, 0.25% 胰蛋白酶在 37℃ 消化 20 min,终止消化后,用弯吸管吸取碎骨片,均匀

作者单位: 610072 成都,四川省人民医院骨科(唐孝明、刘仲前、王跃、庞健),四川成都大学华西医院骨科(裴福兴、沈彬、王光林)

通讯作者: 唐孝明, Email: tmm. zz@163.com

接种于 25 ml 的培养瓶中 ,翻转培养瓶置 37℃ 体积分数 5% 的孵箱中 2 ~ 3 h ,转正培养瓶并加入含有 20% 小牛血清的 DMEM 培养液后继续培养 ,3 d 后换液 ,7 ~ 10 d 后待细胞融合成单层后再传代培养。从形态和碱性磷酸酶染色对成骨细胞进行鉴定。

1.2 细胞分组

第 2、3 代细胞 ,用 0.25% 的胰蛋白酶消化 ,DMEM 培养液漂洗 2 遍 ,然后配成 1×10^5 的细胞悬液。将细胞悬液加到 6 孔板上 ,每孔 1 ml ,加入 1 ml 含 20% 小牛血清的 DMEM 液后放入 37℃ 箱中培养。待细胞长满后加入 1 ml 以下溶液。A 组 :对照组 ;B 组 :脂多糖组 ,加入脂多糖(浓度为 10 ug/ml) ;C 组 :雌激素 + 脂多糖组 ,在 B 组中加入 17β E₂ 浓度为 1.0 nmol/L。各组细胞在 37℃ 培养箱中分别培养 24、48、72 h、5、7 和 14 d 后进行免疫组化染色。

1.3 免疫组化染色

各组标本用 4% 的多聚甲醛固定 ,3% 正常血清处理 ,用滤纸吸去血清 ,滴加第一抗体 ,30 ~ 60 min ,滴加生物素化的第二抗体(1 :200) ,PBS 液洗 2 次 ,滴加(1 :200 ,提前 30 min 配制) ,37℃ ,30 min ,镜下显色 ,自来水终止 ,苏木素复染 ,室温 4 ~ 5 min ,反蓝 10 ~ 20 min ,脱水 ,透明、封片。结果判断 :以 PBS 液代替一抗作为阴性对照 ,阳性判断标准 :当细胞胞浆内出现棕黄色颗粒染色为阳性细胞 ,每张切片随机 5 个视野 ,每个视野计数 20 个共细胞计数 100 个细胞中阳性细胞比率。

1.4 统计学处理

各组细胞阳性率以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,采用 χ^2 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 成骨细胞显微结构观察

相差显微镜下培养第 3 天可见成骨细胞自颅骨碎片移出 ,呈短梭形或三角形 ,生长于瓶底 ,培养的第 7 ~ 8 天 ,细胞融合成单层。传代细胞在 6 min 内贴壁 ,细胞形态为长梭形、鳞片形、短梭形、圆形。细胞周围有半透明光晕 ,胞核椭圆居中 ,轮廓清晰 ,核内 1 ~ 2 个核仁 ,细胞突起细长 ,常跨越细胞与远处的细胞突起相连接。

2.2 碱性磷酸酶染色

染为紫色者为阳性细胞。原代细胞阳性率为 78.6% ,阳性细胞多为梭形和鳞片形细胞。随着传代次数的增多 ,阳性细胞率随之增加 ,第 3 代为 92.1%。

2.3 免疫组化染色结果

正常培养的成骨细胞有 Bcl-2 的表达 ,为 7.6% ~ 9.5% ,脂多糖组的 Bcl-2 的表达率与同时时间段的正常组细胞比较无显著性差异($P > 0.05$)见表 1。脂多糖组和雌激素 + 脂多糖组阳性率比较有显著性差异($P < 0.05$) ;正常培养的成骨细胞有少量 Bax 表达 ,为 6.2% ~ 7.7% ,脂多糖组细胞的 Bax 表达较正常组明显增加 ,差异有显著性($P < 0.01$) ,高峰期出现在 72 h ,加入雌激素后 Bax 的表达明显下降 ,差异有显著性($P < 0.05$) ,高峰仍在 72 h 见表 2 ;正常培养的成骨细胞有少量 Fas 表达 ,为 4.1% ~ 6.1% ,脂多糖组细胞的 Fas 表达较正常组明显增加 ,差异有显著性($P < 0.05$) ,72 h 达到高峰 ,随后逐渐下降 ,加入雌激素后 Fas 的表达明显下降 ,差异

表 1 各组细胞 Bcl-2 的表达(%)

时间	24 h	48 h	72 h	5 d	7 d	14 d
A	8.5 ± 0.3	9.1 ± 0.15	8.7 ± 0.4	8.4 ± 0.2	9.5 ± 0.17	7.6 ± 0.54
B	7.8 ± 0.31 *	8.2 ± 0.45 *	7.7 ± 0.51 *	7.3 ± 0.56 *	7.9 ± 0.75 *	8.9 ± 0.68 *
C	26.0 ± 3.91 #	23.4 ± 4.8^	25.7 ± 5.2^	21.5 ± 4.4^	24.0 ± 3.1^	25.0 ± 3.0#

注 :与 A 组比较 * $P > 0.05$;与 B 组比较 # $P < 0.05$,^ $P < 0.01$

表 2 各组细胞 Bax 的表达(%)

时间	24 h	48 h	72 h	5 d	7 d	14 d
A	7.6 ± 0.4	6.2 ± 0.5	6.4 ± 0.34	6.9 ± 0.45	7.2 ± 0.7	7.7 ± 0.3
B	21.2 ± 4.45 *	29.1 ± 6.2 *	34.3 ± 5.3 *	27.6 ± 3.4 *	26.1 ± 4.8 *	25.4 ± 3.62 *
C	13.7 ± 2.34 #	15.1 ± 2.6 #	22.4 ± 4.1 #	14.5 ± 2.37 #	13.6 ± 1.78 #	12.4 ± 1.72^

注 :与 A 组比较 * $P < 0.01$;与 B 组比较 # $P < 0.05$,^ $P < 0.01$

表 3 各组细胞 Fas 的表达率(%)

时间	24 h	48 h	72 h	5 d	7 d	14 d
A	4.2±0.15	5.7±0.34	4.1±0.36	5.5±0.41	5.9±0.64	6.1±0.23
B	23.1±2.45*	28.4±3.64*	36.2±3.71*	26.9±2.74*	25.9±2.34#	24.4±3.44*
C	14.5±1.54 [△]	16.1±1.27 [△]	23.6±2.8 [△]	15.7±1.64 [△]	15.2±2.59 [△]	12.9±1.92 [△]

注 :与 A 组比较 * $P < 0.01$,# $P < 0.05$;与 B 组比较 $^{\Delta} P < 0.05$

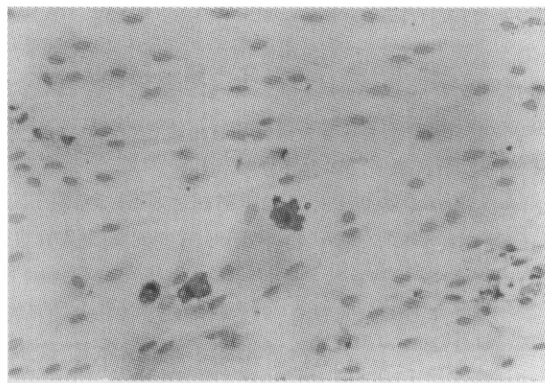


图 1 对照组 Fas 表达(72 h)阳性细胞较少
(胞浆染棕黄色) × 200

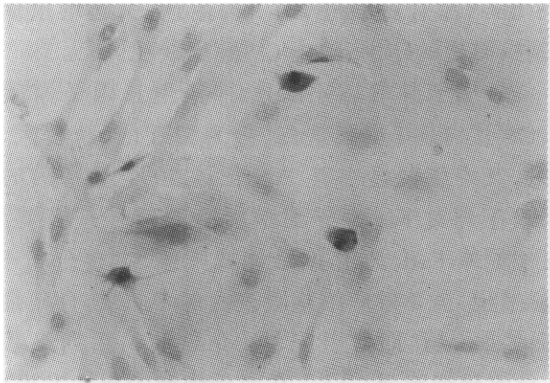


图 3 雌激素 + 脂多糖组 Fas 表达(72 h)
阳性细胞较多糖组明显减少 × 200

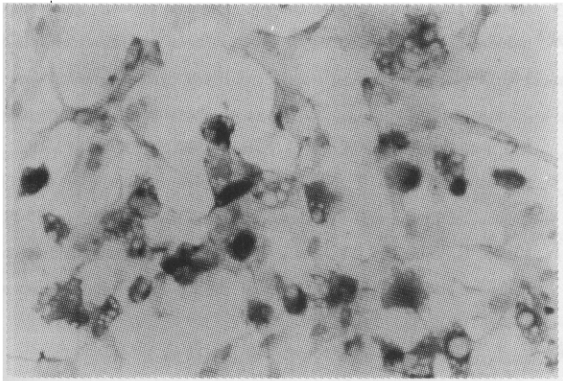


图 2 脂多糖组 Fas 表达(72 h)阳性细胞
较对照组明显增多 × 200

有显著性($P < 0.05$),高峰仍在 72 h ,见表 3。各组细胞 Fas 表达见图 1 ~ 3。

3 讨论

凋亡是由于内外环境变化所激发的细胞自身主动、有序的死亡方式 ,其过程涉及精确的基因转录和蛋白质合成。近年来的研究表明 ,细胞凋亡与多种癌基因和原癌基因的表达有关 ,bcl-2 和 bax 是一对重要的癌基因 ,它们对体内多种细胞的凋亡有调控作用 ,本实验以体外培养的大鼠颅骨成骨细胞为研究对象 ,旨在研究雌激素对脂多糖诱导的成骨细胞凋亡相关因素 Bcl-2、Bax 和 Fas 表达的影响。在矿

化的骨组织小结中 Lynch 等^[2]发现有 bcl-x1、bax 基因的表达 ,bax 的表达能促进细胞的凋亡 ,bcl-2 则有利于软骨细胞和骨细胞生存直到成熟并能抑制成骨细胞的凋亡。作为一种治疗骨质疏松的药物 ,Vitamin k 2 是通过抑制 Fas 和 Bax 的表达从而抑制成骨细胞凋亡起治疗作用的^[3]。在人成骨样细胞 MG 63 细胞的凋亡是因 Bcl-2/Bax 的比值减小引起的^[4]。可的松诱导成骨细胞凋亡时 Bcl-2/Bax 比值降低 ,而给予 17 β E₂ 时 Bcl-2/Bax 比值升高 ,同时成骨细胞凋亡减少^[5]。说明雌激素对成骨细胞 Bcl-2、Bax 和 Fas 的表达可能有影响。本研究结果发现 ,在正常培养的大鼠成骨细胞上有少量 Bcl-2、Bax 和 Fas 的表达 ,其表达并不随培养时间的延长而有所变化。在脂多糖组 ,加入脂多糖后 24 h 即可见 Bax 表达较正常培养细胞组明显增强 ,72 h 达到高峰 ,72 h 以后逐渐下降 ,14 d 时仍高于正常组 ,而 Bcl-2 的表达则无明显变化 ;在脂多糖 + 17 β E₂ 组 ,Bcl-2 的表达显著增强 ,Bax 的表达则显著减弱 ,Bax 的表达高峰期仍为 72 h ,表明脂多糖通过使 Bax 的表达增强、Bcl-2/Bax 比值减小诱导大鼠成骨细胞凋亡 ,雌激素通过使 Bcl-2 的表达上升、Bax 的表达下降、Bcl-2/Bax 的比值升高从而抑制脂多糖诱导的大鼠成骨细胞的凋亡 ,雌激素对脂多糖诱导的大鼠成骨细胞 Bax 表达的高峰期并无影响。说明雌激素能通过成骨细胞表

面的雌激素受体抑制 Bax 的表达,促进 Bcl-2 的表达,使 Bcl-2/Bax 比值升高,从而抑制脂多糖诱导的大鼠成骨细胞凋亡。Bcl-2 表达的增强可通过以下途径抑制成骨细胞的凋亡:抑制白细胞介素-1 β 转换酶(ICE)转变成为有活性的 ICE;抑制线粒体内的细胞色素 C 氧化酶释放出来,而该酶与凋亡有关;有抗氧化作用,减少氧自由基的产生;Bcl-2 N 端的 BH 4 与 Raf-1 结合后促进 Raf-1 的活性,引起增殖从而达到抗凋亡的作用;阻止 Ca^{2+} 穿出线粒体^[6]。

Fas 属于肿瘤坏死因子/神经生长因子家族成员,Fas 蛋白是 I 型膜蛋白,分为胞外区、跨膜区、胞浆区,其中胞浆区中有一段长约 70 个氨基酸的序列,该序列对 Fas 传导细胞凋亡的信号是必要的。Fas 的配体 FasL 为 II 型受体式配体,主要分布于 T 效应细胞,当 T 效应细胞膜表面的 FasL 结合靶细胞表面的 Fas 后,即可引起 Fas 介导的一系列级联反应,导致靶细胞凋亡^[7]。在成骨细胞的凋亡发生中,Fas 起重要的作用,作为一种治疗骨质疏松的药物,Vitamin k 2 是通过抑制 Fas 和 Bax 的表达从而抑制成骨细胞凋亡起治疗作用的^[3]。本研究发现,在体外培养的大鼠成骨细胞也有少量 Fas 表达,在脂多糖组,加入脂多糖后 24 h Fas 的表达较正常培养细胞组明显升高,72 h 达到高峰,其后逐渐下降,但 14 d 时仍高于正常细胞组;在脂多糖 + 雌激素组,Fas 的表达显著低于脂多糖组,但 Fas 表达的高峰期仍为 72 h;脂多糖能诱导大鼠成骨细胞的 Fas 表达增强,雌激素能抑制脂多糖促进成骨细胞 Fas 表达的效应。在体内,Fas 和 FasL 结合后能激活白细胞介素-1 β 转换酶(ICE)和 CPP 32 降解(ADP-ribose)聚合酶而引起染色体断裂和凋亡^[8],雌激素可通过其受

体作用于成骨细胞抑制 Fas 的表达从而抑制凋亡。

脂多糖能使成骨细胞的 Bax 的表达增强、Bcl-2/Bax 比值减小诱导成骨细胞凋亡,雌激素能使 Bcl-2 表达增强、Bax 表达减弱从而使 Bcl-2/Bax 值增大抑制脂多糖诱导的成骨细胞凋亡;脂多糖使成骨细胞的 Fas 表达增强,而雌激素使 Fas 的表达减弱。雌激素通过其受体对成骨细胞 Bcl-2、Bax 和 Fas 表达的调控抑制成骨细胞的凋亡。

【参考文献】

- [1] 李克强,伍汉文.去卵巢大鼠骨质疏松凋亡细胞及相关因素观察.中华内科杂志,2001,40(2):98-100.
- [2] Lynch MP, Capparelli C, Stein JL, et al. Apoptosis during bone-like tissue development *in vitro*. J cell Biochem, 1998, 68: 31-49.
- [3] Urayama S, Kawakami A, Nakashima T, et al. Effect of vitamin k2 on osteoblast apoptosis: vitamin k2 inhibits apoptotic cell death of human osteoblast induced by Fas, proteasome inhibitor, etoposide, and staurosporine. J Lab Clin Med, 2000, 136: 181-193.
- [4] Abe Y, Kawakami A, Nakashima T, et al. Etidronate inhibits human osteoblast apoptosis by inhibition of proapoptotic factors produced by activated T cells. J Lab Clin Med, 2000, 136: 344-354.
- [5] Gohel A, McCarthy MB, Gronowicz G. Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis osteoblast *in vivo* and *in vitro*. Endocrinology, 1999, 140: 5339-5347.
- [6] Shimizu S, Eguchi Y, Kosaka H, et al. Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-x1. Nature, 1995, 374(374): 811-816.
- [7] Ogasawara J, Suda T, Nagata S. Selective apoptosis of CD4-CD8-thymocytes by the anti-Fas antibody. J Exp Med, 1995, 181: 485-493.
- [8] Masato E, Talamian RV, Wong WW, et al. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. Nature, 1996, 380: 723-726.