

17 β -雌二醇对体外培养破骨细胞凋亡及其骨吸收调节作用

孟增东 裴福兴 向明 沈彬 杨天府 杨静 屠重棋

摘要：目的 观察 17 β -雌二醇对体外培养破骨细胞凋亡率的影响及其与骨吸收功能的关系。方法 在培养液中加入 17 β -雌二醇，透射电镜 (transmission electron microscopy, TEM) 观察破骨细胞内超微结构的改变，流式细胞仪 (flow cytometry, FCM) 观察不同浓度的 17 β -雌二醇在不同时间段对破骨细胞凋亡率的影响，同时用扫描电镜 (scanning electron microscopy, SEM) 观察破骨细胞在骨片上形成骨吸收陷窝数目及面积的变化。结果 17 β -雌二醇可增加破骨细胞的凋亡率，这种作用具有剂量、时间依赖效应，同时，破骨细胞在骨片上形成的骨吸收陷窝的数目和面积减少。结论 17 β -雌二醇可促进破骨细胞凋亡，从而抑制破骨细胞的骨吸收功能。

关键词：17 β -雌二醇；破骨细胞

Effects of 17 β -estradiol on the apoptosis and bone resorption in cultured osteoclasts *in vitro* MENG

Zengdong ,PEI Fuxing ,XIANG Ming ,et al . 1st People's Hospital of Yunnan Province ,Kunming 650032 ,China

Abstract : **Objective** To study the effect of 17 β -estradiol (17 β E₂) on the apoptosis of cultured osteoclasts and the relationship with the bone resorption of osteoclasts *in vitro*. **Methods** 17 β E₂ in different concentration was added to osteoclasts culture medium. The ultrastructural changes of osteoclasts were observed with transmission electron microscopy (TEM). The percentage of apoptotic osteoclasts were measured with flow cytometry (FCM) and the area and number of resorption pits with scanning electric microscopy. **Results** 17 β E₂ promoted the apoptosis of osteoclasts *in vitro* in a dose- and time- dependent manner. The area and number of the resorption pits decreased.

Conclusions 17 β E₂ can induce apoptosis of osteoclasts *in vitro* while inhibit the bone resorption.

Key words : 17 β -estradiol ; Osteoclast

绝经或卵巢切除引起的雌激素缺乏可导致病理性的骨量丢失，这种骨量丢失可用雌激素替代疗法预防。雌激素预防骨量丢失主要是通过抑制破骨细胞的骨吸收功能来完成的，但它的确切作用机制尚不甚清楚^[1]。

破骨细胞的凋亡在骨质疏松的发病机制中具有重要意义。有研究表明，多种药物和细胞因子通过促进破骨细胞的凋亡而抑制其骨吸收^[2,3]。雌激素可通过与破骨细胞膜上的雌激素受体结合直接作用于破骨细胞，抑制其骨吸收功能^[4]。这种作用是否与其促进破骨细胞的凋亡有关？本研究在体外培养大鼠破骨细胞的基础上，观察雌激素对促进体外培养破骨细胞凋亡的作用，以及雌激素对破骨细胞骨

吸收功能的抑制作用，探讨雌激素对破骨细胞骨吸收功能的调节机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和设备

α -MEM 培养基和胎牛血清 (Gibco, USA)，17 β -雌二醇 (Sigma, USA)，超净工作台，二氧化碳孵箱 (Sanyo, Japan)，CoulterpicsSP 流式细胞仪 (Coulter, USA)，JEM-100 SX 型透射电子显微镜、ARMARY-1000 B 型扫描电子显微镜、OLYMPUS 显微摄像镜、MIAS-2000 图像分析仪。

1.2 骨片的制作

取新鲜牛股骨干致密骨，以低速锯式切片机横切，厚约 80 μ m，0.8 cm $\times$ 0.8 cm 大小，再用毛玻璃片磨成 50 μ m 厚的薄片，超声波清洗仪行超声清洗 3 次，每次 10 min。临用前以 75% 酒精浸泡 24 h 后取出，紫外灯照射 12 h。

作者单位：650032 昆明，云南省第一人民医院骨科 (孟增东)；
四川大学华西医院骨科 (裴福兴、向明、沈彬、杨天府、杨静、屠重棋)

通讯作者：孟增东，Email: menggu7119@vip.sina.com

1.3 破骨细胞体外分离培养、鉴定及实验分组

根据 Gay 等^[5]报道的方法,拉颈处死出生 24 h 内的 Wistar 雌性大鼠,体重(50 ± 13) g, 75% 乙醇浸泡 5 min, 分离股骨、胫骨和肱骨, 清除骨表面的软组织, 骨干部用 α -MEM 培养液洗 2 次, 放入培养液(培养液 1000 ml α -MEM 25 mmol/L, 15% 胎牛血清 25 mmol/L Herpes 6 g, L-谷氨酰胺 30 mg, 丙酮酸钠 100 mg, NaHCO_3 2 g, 青霉素 G 0.15 g, 硫酸链霉素 0.12 g)内, 用解剖刀将骨质轻轻刮入培养液内, 再用圆头吸管反复吹打骨质碎片 2 min, 将附着于碎片上的破骨细胞冲入培养液内, 离心 $300 \text{ r/min} \times 3 \text{ min}$, 去除骨组织, 将细胞液吸出移置到另一离心管中, 离心 $1500 \text{ r/min} \times 7 \text{ min}$, 制成密度约为 10^5 个/ml 的细胞悬液, 接种于放置骨片的 6 孔细胞培养板内, 置二氧化碳培养箱, 在 5% CO_2 , 37℃ 条件下静置培养 40 min; 用 α -MEM 冲掉未贴壁细胞, 贴壁细胞重新收集, 更换培养液, 继续培养。所培养的破骨细胞用抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色法进行鉴定。实验共分对照组及 17 β -雌二醇浓度分别为 $10^{-5} \sim 10^{-9}$ mol/L 的 5 个处理组, 分别于 17 β -雌二醇作用 6、12、18、24 h 后进行下述观察。

1.4 17 β -雌二醇对破骨细胞形态及超微结构的影响

1.4.1 用相差倒置显微镜及光镜对细胞进行直接观察。

1.4.2 透射电镜观察 17 β -雌二醇对破骨细胞超微结构的影响 0.25% 胰酶消化收集各实验组及对照组于骨片上培养 24 h 的破骨细胞, PBS 液洗 2 次, 4000 r/min 离心 10 min, 0.3% 戊二醛 4℃ 下混匀、固定 2~24 h, 10000 r/min 离心 15 min, 顺管壁加入 3% 戊二醛 4℃ 固定 2 h 后, 脱水, 包埋, 超薄切片, 于透射电镜下观察。

1.5 破骨细胞凋亡率测定

采用碘化丙啶(propidium iodide, PI)插入 DNA 定量染色法^[6]。于各组破骨细胞分别培养 6、12、18、24 h, 常规消化、收集细胞, 用 PBS(不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} , pH 7.4 0.15 mol/L)洗涤 2 次, 冲入 -20℃ 75% 冰乙醇固定细胞待测, 检测前离心($1200 \text{ r/min} \times 3 \text{ min}$); 去除固定液, 用 PBS 充分洗涤 2 次后, 加入 0.5 ml PBS 液制成细胞悬液标本, 按 1:50 的体积分数比悬浮于 2 ml 左右含 0.1% Triton-X-100, 50 $\mu\text{g/ml}$ PI, 5 g/L RNAase, 轻震荡使细胞分离; 置于 -40℃ 避光染色 60 min, 以 400 目筛网过滤后, 调整细胞浓度, 上机检测。检测波长为 488 nm 氩离子激光。每份样本检

测 5000~10000 个细胞。用 multicycle DNA 分析软件进行细胞凋亡率的测定。

1.6 破骨细胞骨吸收功能的观察

用扫描电镜观察对照组及各实验组破骨细胞在骨磨片上形成的骨吸收陷窝。扫描电镜标本的制备: 骨片上的细胞培养 4 d, 以 2.5% 戊二醛固定; 部分骨片以 0.25 mol/L 氢氧化铵超声处理 10 min, 清除骨片上的破骨细胞, 再以 2.5% 戊二醛固定。上述骨片再经 1% 锇酸固定, 酒精系列脱水, 醋酸异戊酯置换酒精, 二氧化碳临界点干燥, 镀金。扫描电镜观察。对扫描电镜图像用 MIAS-2000 图像分析仪分析不同浓度雌激素形成骨吸收陷窝的数目和面积。

1.7 统计学方法

数据均以均数 $\pm$ 标准误表示(先经正态性检验), 所有结果均用 SPSS 10.0 作单因素方差分析, 对照组与实验组之间的差异性判断通过组间 t 检验进行统计学分析, 对不同实验组破骨细胞凋亡率与骨吸收陷窝数目和面积之间的关系作相关分析。

2 结果

2.1 破骨细胞培养鉴定结果

所培养的细胞通过 TRAP 染色法鉴定证实是破骨细胞-TRAP 染色酶活性部位呈酒红色, 分布于破骨细胞胞浆内, 核为阴性(图 1)。

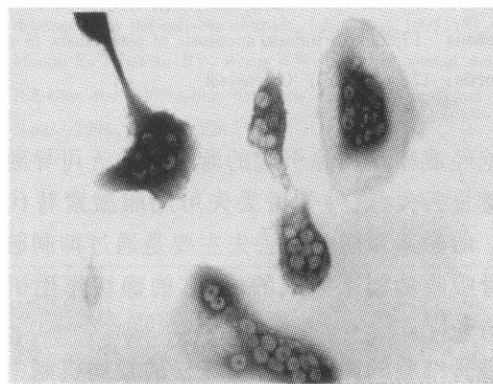


图 1 对照组破骨细胞体积较大, 呈腊肠形, 内含约 30 个细胞核, 染色质颗粒细小, 分布均匀(相差倒置显微镜 $\times 400$)

2.2 17 β -雌二醇对破骨细胞形态及超微结构的影响

对照组破骨细胞形态不规则, 呈油煎蛋形、长条形、腊肠形或漏斗形等, 有片状或丝状伪足, 细胞内可见几个到几十个核不等, 染色质颗粒细小, 分布均匀, 细胞边界清楚(图 2)。实验组破骨细胞皱缩变形, 部分细胞核内染色质浓集、边聚、核仁消失、核内空旷(图 3)。透射电镜下观察, 可见这部分细胞符

合凋亡细胞的形态学改变 :核内染色质浓集、边聚 (margination) 核仁消失 细胞表面起泡(图 4 , 5)

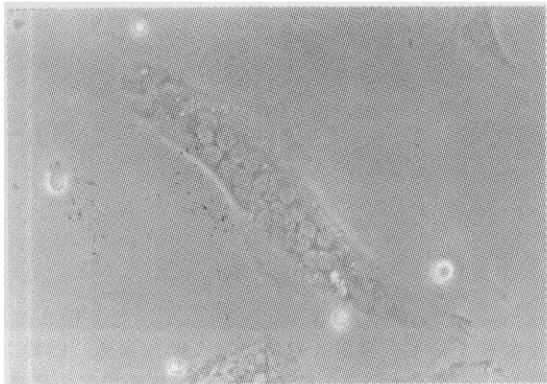


图 2 TRAP 染色酶活性部位呈酒红色,分布于破骨细胞胞浆内,核为阴性,证实所培养的为破骨细胞(光镜 × 200)

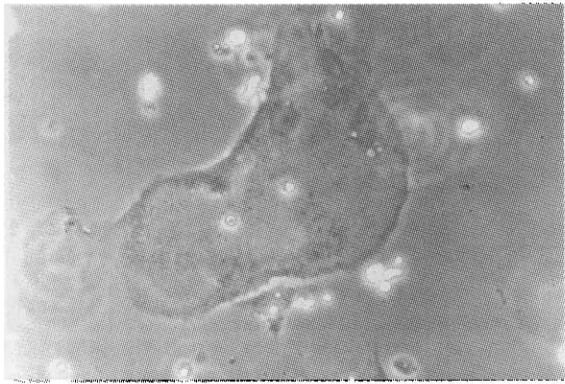


图 3 实验组破骨细胞核内空旷,核仁消失(相差倒置显微镜 × 400)

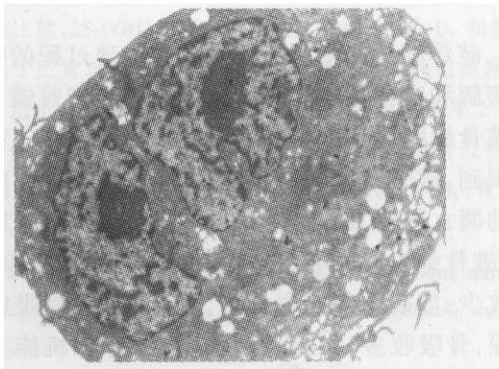


图 4 对照组破骨细胞核内染色质分布均匀,核仁清晰(透射电镜 × 400)



图 5 实验组破骨细胞核内染色质浓集、边聚,核仁消失(透射电镜 × 400)

2.3 17β-雌二醇对破骨细胞凋亡率的影响

流式细胞仪检查结果显示 ,培养的破骨细胞有一定的基础凋亡率 ,约为 2.5%。不同浓度的 17β-雌二醇在不同作用时间均有增加破骨细胞凋亡率的作用。这种作用具有剂量及时间依赖效应 :各实验组

在作用 24 h 后破骨细胞凋亡率达最高 ,在各浓度组中 ,10⁻⁷ ~ 10⁻⁵ mol/L 的 17β-雌二醇所致破骨细胞凋亡率与对照组相比有显著性差异(*P* < 0.01),而 10⁻⁷ mol/L 以下浓度的 17β-雌二醇略增加破骨细胞凋亡率 ,但与对照组比较无显著性 ,见表 1。

表 1 不同浓度的 17β-雌二醇在不同作用时间对破骨细胞凋亡率的影响

17β-雌二醇浓度 (mol/L)	破骨细胞凋亡率(%)				
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h
0	2.52 ± 0.29	2.57 ± 0.15	2.64 ± 0.17	2.59 ± 0.21	2.87 ± 0.31
10 ⁻⁹	2.45 ± 0.21	2.84 ± 0.24	3.15 ± 0.16	3.33 ± 0.15 *	3.64 ± 0.18 *
10 ⁻⁸	2.63 ± 0.30	4.38 ± 0.22 *	5.02 ± 0.17 *	5.49 ± 0.46 *	5.93 ± 0.36 *
10 ⁻⁷	2.53 ± 0.29	5.53 ± 0.24 *	6.24 ± 0.35 *	9.41 ± 0.25 *	13.65 ± 0.84 *
10 ⁻⁶	2.41 ± 0.28	5.75 ± 0.27 *	7.97 ± 0.57 *	11.35 ± 0.78 *	15.67 ± 0.96 *
10 ⁻⁵	2.56 ± 0.23	6.78 ± 0.38 *	9.43 ± 0.29 *	13.68 ± 0.47 *	19.75 ± 0.72 *

注 :与对照组比较 * *P* < 0.01

2.4 破骨细胞骨吸收功能的观察

扫描电镜下的破骨细胞形态多样 ,细胞表面有大量伪足样突起 ,其在骨片上形成典型的骨吸收陷

窝 ,陷窝呈圆形、椭圆形或不规则形 ,有时成串出现 ,陷窝边界清晰 ,底面粗糙 ,有纤维样基底 ,与骨片本身的血管通道及骨细胞陷窝明显区分(图 6)。

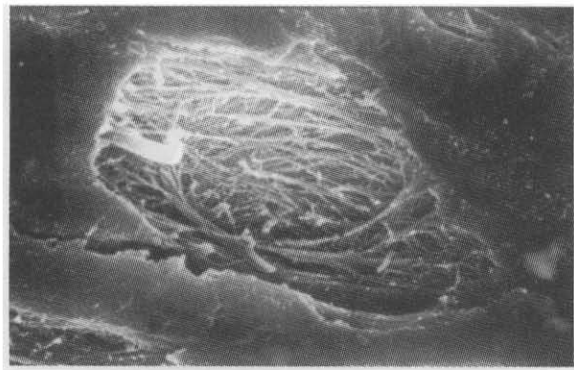


图 6 所培养的破骨细胞在骨片上形成典型的骨吸收陷窝，陷窝呈圆形、椭圆形或不规则形，有时成串出现，陷窝边界清楚，底面粗糙，有纤维样基底(扫描电镜×800)

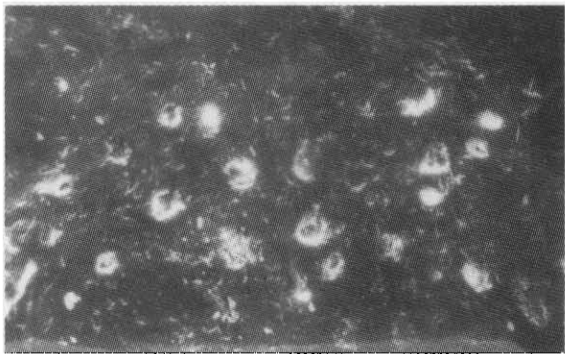


图 8 实验组破骨细胞在骨片上形成的骨吸收陷窝数目较少(扫描电镜×200)

MIAS-2000 图像分析仪观察不同浓度 17β-雌二醇对破骨细胞骨吸收功能的影响，结果发现，与空白对照组比较， $10^{-5} \sim 10^{-7}$ mol/L 17β-雌二醇处理组，骨片上形成骨吸收陷窝的数目和面积显著减少($P < 0.01$)，3 个实验组之间差异无显著性，低于 10^{-7} mol/L 浓度的 17β-雌二醇(10^{-8} 、 10^{-9} mol/L)处理组，骨片上形成的骨吸收陷窝数目和面积有所减少，但与对照组比较，差异无显著性，见表 2(图 7、8)。

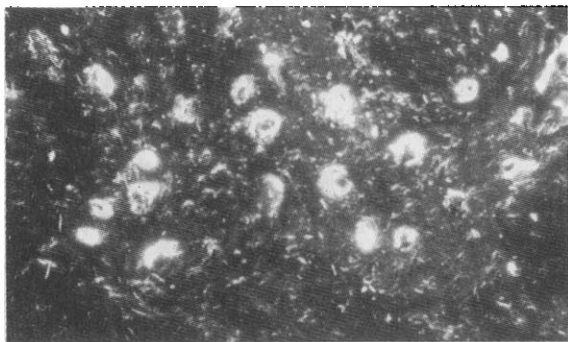


图 7 对照组破骨细胞在骨片上形成的骨吸收陷窝数目较多(扫描电镜×200)

表 2 不同浓度 17β-雌二醇处理后破骨细胞形成骨吸收陷窝的数目和面积

17β-雌二醇浓度(mol/L)	骨陷窝数目(个/片)	骨陷窝面积(μm ²)
0	41 ± 6	632 ± 41
10 ⁻⁹	36 ± 7	643 ± 66
10 ⁻⁸	34 ± 6	506 ± 47
10 ⁻⁷	29 ± 5 *	444 ± 53 *
10 ⁻⁶	20 ± 4 *	297 ± 32 *
10 ⁻⁵	15 ± 5 *	227 ± 29 *

注：与对照组比较 * $P < 0.01$

3 讨论

破骨细胞的主要功能是在骨重建过程的吸收相中溶解和吸收骨盐和骨基质。过去人们曾错误地认为破骨细胞在完成使命后变成成骨细胞，现在人们认识到，破骨细胞的消失是由于凋亡。这种破骨细胞的凋亡在骨质疏松症的发病机制中具有重要意义。破骨细胞凋亡早、凋亡多，则骨吸收的程度浅，骨吸收少；如破骨细胞凋亡晚、凋亡少，则骨吸收的程度深，骨吸收多，如骨质疏松、甲状旁腺机能亢进的骨破坏等^[7]。骨质疏松症治疗的目标是尽可能地抑制病理性骨吸收，增加骨形成。骨吸收的减少依赖于破骨细胞骨吸收的减少。因此，如何促进破骨细胞凋亡，在骨质疏松症的治疗中具有重要意义。

同其他的研究结果一样^[8]，本研究结果证实，雌激素可直接作用于体外培养的破骨细胞，抑制其骨吸收功能。而且这种作用具有剂量依赖效应，生理浓度及其以上的 17β-雌二醇可显著减少破骨细胞在骨片上形成的骨吸收陷窝的数目和面积，而低于生理浓度的 17β-雌二醇，虽然也有相同作用，但与对照组比较差异无显著性。

雌激素抑制破骨细胞骨吸收的调节机制，很多研究^[9,10]认为，雌激素是通过间接调节机制来完成的。缺乏雌激素可导致卵巢切除动物体内 IL-1、IL-6 和 TNF-α 的分泌增加和骨组织中 TGF-β 的表达减少，从而导致破骨细胞生成增多，破骨细胞的骨吸收功能活跃^[9]，也有观察认为，雌激素是通过成骨细胞介导机制来抑制破骨细胞骨吸收功能^[10]。本研究结果证明，同其他药物和细胞因子一样^[2,3]，雌激素可直接作用于破骨细胞，促进破骨细胞的凋亡，而且这种作用具有剂量及时间依赖效应，与破骨细胞在

(下转第 65 页)

(上接第 32 页)

骨片上形成骨吸收陷窝数目和面积的减少呈相关性,这说明雌激素抑制破骨细胞的骨吸收功能部分与其促进破骨细胞的凋亡有关。

【参 考 文 献】

- [1] Bord S ,Beavan S ,Ireland D ,et al. Mechanisms by which high-dose estrogen therapy produces anabolic skeletal effects in postmenopausal women :role of locally produced growth factors. *Bone* 2001 29 216-222.
- [2] Kameda TK ,Miyazawa Y ,Mori T ,et al. Vitamin K2 inhibits osteoclastic bone resorption by inducing osteoclast apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* ,1996 220 515-519.
- [3] Hughes DE ,Wright KR ,Uy HL ,et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts *in vitro* and *in vivo* . *J Bone Miner Res* , 1995 ,10 :1478-1487.
- [4] Mano H ,Yuasa T ,Kameda T ,et al. Mammalian mature osteoclasts as estrogen target cells. *Biochem Biophys Res Commun* ,1996 ,223 :

637-642.

- [5] Gay CV ,Kief NL ,Bekker PJ. Effect of estrogen on acidification in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* ,1993 ,192 :1251-1259.
- [6] 方福德 杨焕明 ,张德昌 ,等. 分子生物学前沿技术. 北京 :北京医科大学中国协和医科大学出版社 ,1998. 148-149.
- [7] Hughes DE ,Wright KR ,Uy HL ,et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts *in vitro* and *in vivo* . *J Bone Miner Res* ,1995 ,10 :1478-1487.
- [8] Quaedackers ME ,Van Den Brink CE ,Wissink S ,et al. 4-hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kappa B activity in human osteoblastic U2-OS cells through estrogen receptor (ER) alpha ,and not through ER beta. *Endocrinology* ,2001 ,142 :1156-1166.
- [9] Horowitz MC. Cytokines and estrogen in bone :antiosteoporotic effects. *Science* ,1993 260 626-627.
- [10] Qu Q ,Harkonen PL ,Monkkonen J ,et al. Conditioned medium of estrogen-treated osteoblasts inhibits osteoclast maturation and function *in vitro* . *Bone* ,1999 25 211-215.

(收稿日期 :2004-12-04)