

雌激素调节大鼠去卵巢后骨髓细胞 OPG、RANKL、RANK 基因表达

曾天舒 潘世秀 陈璐璐 夏文芳

摘要：目的 观察大鼠去卵巢后骨髓细胞核因子 κ B 受体活化子配体(RANKL)、核因子 κ B 受体活化子(RANK)、护骨素(OPG)以及 TNF- α 基因表达的改变和雌激素的影响。方法 健康 3 月龄雌性 SD 大鼠 72 只,24 只为假手术对照组,48 只去卵巢,随机分为去卵巢组和雌激素组,每组 24 只。分别于去卵巢后 2、4、6、12 w 每组各取 6 只大鼠骨髓细胞提取 RNA,RT-PCR 半定量分析其表达。结果 与对照组相比,去卵巢后 2 w,去卵巢组骨髓细胞 TNF- α 和 RANKL mRNA 表达显著升高($P < 0.05 \sim 0.01$),第 4 ~ 6 w,上述改变达高峰,至第 12 w TNF- α 仍呈有意义增高;而 OPG 表达在第 2 ~ 6 w 则明显降低($P < 0.01$),2 ~ 4 w 为最低点,OPG/RANKL 比值 2 ~ 6 w 为最低($P < 0.01$),12 w 仍低于对照组。雌激素组以上各时间 TNF- α 和 RANKL 表达低于去卵巢组($P < 0.05$, $P < 0.01$)而 OPG 表达和 OPG/RANKL 比值明显高于去卵巢组($P < 0.01$)。各组全程未见 RANK 基因表达水平有明显变化。结论 雌激素抑制大鼠去卵巢后骨髓细胞过度表达 RANKL 和 TNF- α 而增加 OPG 的表达。

关键词：雌激素；骨髓；护骨素；肿瘤坏死因子 α ；核因子 κ B 受体活化子配体

Regulation of estrogen on osteoprotegerin, RANKL and TNF- α gene expression in bone marrow of ovariectomized rats ZENG Tianshu, PAN Shixiu, CHEN Lulu, et al. Department of Endocrinology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Abstract : Objective To observe the changes of gene expression of receptor activator of NF- κ B ligand(RANKL), receptor activator of NF- κ B(RANK), osteoprotegerin(OPG) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in bone marrow of ovariectomized rats and the effects of estrogen treatment. **Methods** Seventy-two healthy female SD rats 3 months old, were randomly divided into three groups(24 in each): the sham-operated control group(A), the ovariectomized group(B) and the estrogen treated group after ovariectomy(C). Bone marrow cells of 6 rats from each group were respectively collected at four different time points(2nd, 4th, 6th and 12th weeks post operation) and total RNA was extracted by TRIZOL. **Results** From the 2nd week after the operation, RANKL and TNF- α genes expression was significantly increased in Group B($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and reached the peak in the 4th to 6th week. The increased expression of TNF- α was maintained till the 12th week. In the 2nd to 6th week, OPG gene expression decreased significantly in group B. The lowest level were at 2nd to 4th week. The OPG/RANKL ratio reached the lowest level in 2nd to 6th week till 12th week. No significant change of RANK gene expression was revealed in the whole courses. **Conclusions** Estrogen inhibits the over expression of TNF- α and RANKL gene and promote OPG gene expression in bone marrow of rats after ovariectomy.

Key words: Estrogen; Bone marrow; Receptor activator of NF- κ B ligand; Tumor necrosis factor- α ; Osteoprotegerin

雌激素缺乏是绝经后骨质疏松症的主要病因,但是雌激素缺乏导致骨吸收亢进的原因还不清楚。

上世纪九十年代后期核因子 κ B 受体活化子配体(RANKL)和护骨素(osteoprotegerin, OPG)的发现使人们对骨吸收的调控机制有了更深入的认识。多种调节骨代谢的激素和细胞因子通过影响成骨细胞和骨髓微环境中其他细胞 RANKL、OPG 的表达发挥作用。对培养的成骨细胞的研究发现雌激素可以直接或者通过影响某些细胞因子间接影响 RANKL、OPG

基金项目：国家自然科学基金资助项目(No. 39770930)

作者单位：430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院内分泌科(曾天舒、陈璐璐、夏文芳)检验科(潘世秀)

通讯作者：曾天舒, Tel: 027-85726130, Email: tszeng@126.com

的基因表达水平。但是动物去卵巢后 RANKL ,OPG 与这些细胞因子基因表达的动态变化报道不多。我们曾经报道大鼠去卵巢后骨髓源性破骨细胞的形成增加与 IL-6 和 IL-6 受体 mRNA 表达增加有关^[1] ,由于 IL-6 具有调节 RANKL ,OPG 的作用 ,因此去卵巢后破骨亢进可能与 OPG、RANKL 变化有关。为了进一步了解雌激素缺乏导致骨质疏松的机制 ,我们观察了大鼠去卵巢后骨髓细胞 OPG、RANKL 和 RANK 以及另外一个重要的 OPG、RANKL 调节因素 TNF- α 基因表达的变化。

1 材料和方法

1.1 去卵巢大鼠模型的建立和药物处理

健康 3 m 龄雌性 SD 大鼠 72 只 ,体重 210 ~ 230 g (华中科技大学同济医学院实验动物中心提供) ,24 只作为假手术对照组 ,48 只经腹手术去卵巢后随机分为 2 组分别为去卵巢组、雌激素组。雌激素组手术当天按 0.2 mg/kg 体重皮下注射苯甲酸雌二醇 1 次 ,此后每周 1 次。正常对照组、去卵巢组相应时间皮下注射生理盐水。分别于去卵巢后 2、4、6、12 w 取每组各 6 只大鼠骨髓细胞作细胞培养和提取总 RNA。

1.2 骨髓细胞基因表达的检测

无菌操作下完整取出一侧股骨 ,剪断两侧骨髓端 ,用 5 mL PBS 反复冲洗骨髓腔 3 次获得细胞悬液 ,后用 TRIZOL(美国 GIBCO 公司) 提取总 RNA ,oligo (dT) 作为引物 ,进行逆转录 ,逆转录酶为 Roche 公司产品 ,PCR 引物序列见下表 :

基因	引物
OPG	Senes 5'-TCCTGGCACCTACCTAAACAGCA-3'
	Antisense 5'-CTACACTCTCTGCATTCACTTTGG-3'
RANKL	Senes 5'-CCATCGGGTTCCCATAAAGTCAGT-3'
	Antisense 5'-AAAGCCCCAAAGTACGTCGCATCT-3'
RANK	Senes 5'-TCACCGGGACTGAAAGCACGGTGG-3'
	Antisense 5'-TGGGCTCCATCACCATGCCAGCAG-3'
TNF- α	Senes 5'-CACCACGCTCTTCTGTCTACTGAAC-3'
	Antisense 5'-CCGGACTCCGTGATGTCTAAGTACT-3'
β -actin	Senes 5'-AACCCCTAAGGCCAACAGTAAAAG-3'
	Antisense 5'-TCATGAGGTACTCTGTGAGGT-3'

PCR 反应体系总体积为 20 μ L ,其中 cDNA 50 ng ,Mg²⁺ 2.5 mmol/L ,dNTP 1 μ L (10 mM) ,引物各 20 pmol ,Taq 酶(Roche 公司) 2.5 U/管。按下列条件进行扩增循环 :首先 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min ,然后 95 $^{\circ}$ C 变

性 30 s ,各对引物分别 60 $^{\circ}$ C (OPG ,RANKL ,TNF- α , β -actin) 或 68 $^{\circ}$ C (RANK) 退火 1 min ,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min ,共 30 个循环。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后进行光密度扫描 ,并以 β -actin 为内参照校正作相对量分析 ,以 β -actin 光密度扫描数值为 100% ,以两者之积分吸光度比值百分数表示(IMAGE 1 图像分析系统 ,同济医学院千屏医学影像公司)。

1.3 统计学处理

数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示 ,各组间差异显著性检验用方差分析 ,组间两两比较用 Q 检验。

2 结果

2.1 去卵巢大鼠骨髓 RANKL、RANK 和 OPG 基因表达的变化 (见图 1 ~ 3)

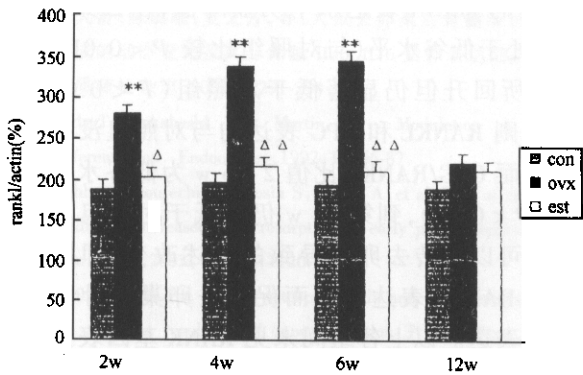


图 1 各组大鼠去卵巢后不同时间骨髓 RANKL 基因表达注 :与对照组比较 , * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与去卵巢组比较 , $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

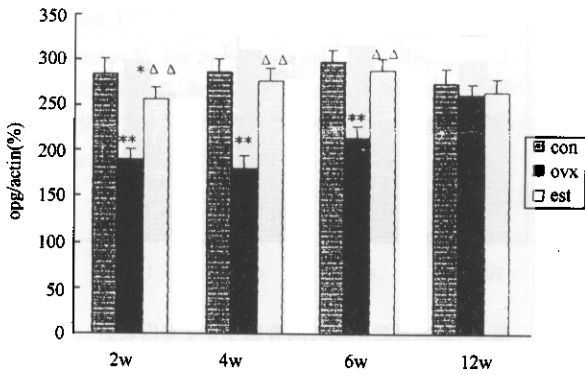


图 2 去卵巢后不同时间骨髓 OPG 基因表达注 :与对照组比较 , * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与去卵巢组比较 , $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

去卵巢组 RANKL 的 mRNA 表达水平在去卵巢后 2 w 时即比对照组有明显升高 ($P < 0.01$) ;在 4 ~ 6 w 时到达高峰水平。与 RANKL 变化相反 ,玄卵巢

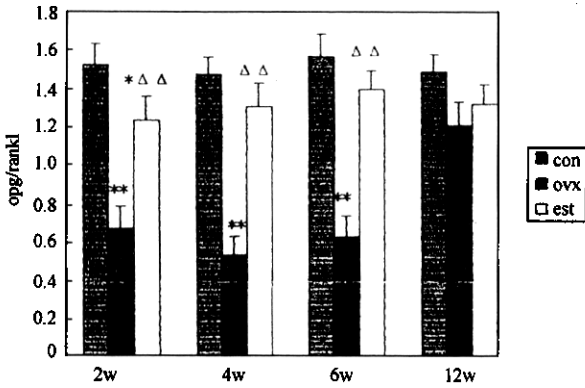


图 3 去卵巢后不同时间骨髓 OPG/RANKL 基因表达相对水平
注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与去卵巢组比较,
 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

后 OPG 的 mRNA 表达水平明显降低,在去卵巢后 2 ~ 4 w 处于低谷水平(与对照组比较 $P < 0.01$),第 6 w 虽有所回升但仍显著低于对照组($P < 0.01$);第 12 w 时则 RANKL 和 OPG 表达均与对照组没有显著差别。而 OPG/RANKL 比值 2 ~ 6 w 为低谷水平,4 w 最低($P < 0.01$),到第 12 w 仍低于对照组。给予雌激素可以逆转去卵巢导致的上述改变,即抑制去卵巢后 RANKL 表达增加而促进去卵巢后骨髓细胞 OPG 的表达。以上各组间未见 RANK 基因表达水平有明显变化。

2.2 去卵巢大鼠骨髓 TNF- α 表达的变化(见图 4)

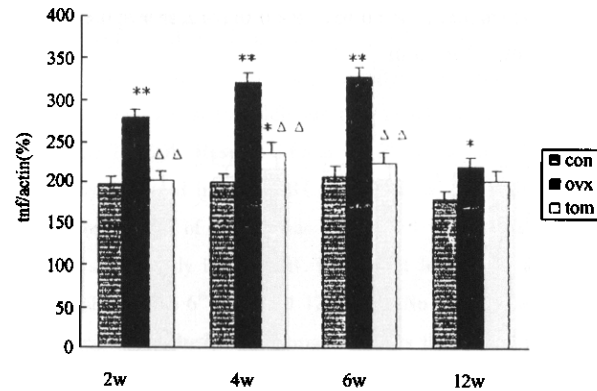


图 4 去卵巢后不同时间骨髓 TNF- α 基因表达
注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与去卵巢组比较,
 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

去卵巢 TNF- α 的 mRNA 表达水平在去卵巢后 2 w 时即比对照组有明显升高($P < 0.01$);在 4 ~ 6 w 时到达高峰水平($P < 0.01$),单纯去卵巢组第 12 w 仍高于对照($P < 0.05$)。雌激素可以明显抑制去卵巢后 TNF- α 的表达增高,除第 4 w 外与对照组没有

显著性差别。

3 讨论

长期以来在研究激素或细胞因子对骨吸收的影响时发现多种因子调节破骨细胞分化常常需要成骨/基质细胞的存在,因此,推测他们通过影响某种直接作用于破骨干细胞的因子发挥作用,这种因子作为共同通路介导上述激素或者细胞因子的作用^[2]。

1997 年由 Simonet 等在对大鼠小肠 cDNA 测序分析时发现一种 TNF 受体超家族成员,因其具有降低破骨细胞分化和活性并增加骨密度的功能而命名为护骨素(osteoprotegerin,OPG)。进一步研究发现了 OPG 的配体(OPGL)是一种可以促进破骨细胞增殖分化和抑制破骨细胞凋亡的因子,分析其序列发现就是 RANKL。它是由成骨/基质细胞分泌的一种属于 TNF- α 家族的细胞因子,通过其位于前体破骨细胞和成熟破骨细胞表面的受体 RANK 发挥调节破骨细胞分化和凋亡的作用。OPG 作为 RANKL 的诱饵性受体(decay receptor),与 RANKL 竞争性结合 RANK,从而抑制破骨细胞的分化和成熟,诱导破骨细胞凋亡。RANKL、OPG 均可由成骨细胞和基质细胞表达,几乎所有重要的骨代谢相关激素和细胞因子均可以通过调节 RANKL 和 OPG 的表达发挥调节骨重建的作用。

雌激素缺乏导致的多种细胞因子分泌异常是导致绝经后骨质疏松症的重要原因。这些细胞因子在体外试验中都体现出调节 OPG、RANKL 的作用,提示后两者可能参与绝经后骨质疏松症的发病。此前对绝经后妇女血循环和去卵巢动物骨组织中 RANKL 和 OPG 表达水平的研究得到一些有争议的结果。但是最近的研究证实绝经后妇女的骨髓基质细胞中存在 OPG 表达降低而 RANKL 表达异常升高,说明骨髓中 RANKL/OPG 的变化是雌激素缺乏导致骨吸收的主要原因之一,使得 OPG/RANKL/RANK 系统的异常在绝经后骨质疏松发病中的重要性受到重视^[3]。但是雌激素水平下降后该系统在整体的动态变化尤其是早期(4 w 以前)的改变还缺乏报道。

在本实验中,我们观察到大鼠去卵巢后 2 w 骨髓细胞 OPG 表达迅速下降,而 RANKL 表达明显升高,后者在 4 ~ 6 w 达到高峰,OPG/RANKL 比值在 2 ~ 6 w 明显低于对照组,其时机和我们报道的大鼠去卵巢后骨髓源性破骨细胞形成在 4 ~ 6 w 达到高峰相一致^[1]。去卵巢后立即给予雌激素可以使上述

基因表达的异常恢复到接近正常水平。在去卵巢大鼠中 OPG、RANKL 基因表达的改变与人类的变化类似^[3],说明去卵巢大鼠是研究绝经后骨质疏松症发病机制的良好模型。通过对去卵巢后的动态观察发现在去卵巢早期 OPG、RANKL 表达变化就十分明显,即使经过较长时间,单独观察 OPG 或 RANKL 表达水平已无显著差别时,OPG RANKL 相对水平仍有异常,这一结果可以解释我们曾经观察到的去卵巢后 12 w 骨髓源性破骨细胞形成仍然高于对照组的现现象^[1]。

在雌激素缺乏时,RANKL、OPG 表达改变涉及多种机制,一方面已经证实雌激素可以直接通过雌激素受体调节他们的基因表达^[4],另一方面作为旁分泌因素促进破骨细胞生成的细胞因子,如:IL-1、IL-6 和 TNF- α 也参与对他们的调节。有研究表明 IL-6 由 gp130 途径介导上调大鼠 RANKL mRNA 表达。但是也有人认为 IL-6 的作用是独立于 OPG、RANKL 系统的^[5]。我们曾经报道大鼠去卵巢后 2~6 w 骨髓 IL-6 及其受体基因表达上升^[1],这种与 OPG、RANKL 基因表达一致的变化趋向可能有助于解释它们的表达改变。

肿瘤坏死因子- α 是另一个重要的骨代谢调节因子。TNF- α 调节骨吸收主要是通过促进破骨细胞的增殖、分化和功能实现的。早年研究证实 TNF- α 可以促进巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和 IL-6 的表达。近年的研究表明 TNF- α 不仅可以上调 RANKL mRNA 表达、下调 OPG mRNA 表达,而且 RANKL 可显著加强 TNF- α 的作用^[5],这可能是 TNF- α 促进破骨的主要作用基础。有研究提示 TNF- α 可以直接作用于破骨细胞,但这种作用弱于通过 RANKL 发挥的作用^[6]。

在破骨细胞中雌激素受体表达水平很低,因此目前认为,雌激素对骨吸收的抑制作用主要是通过调节相关的细胞因子及其信号传递发挥的^[7]。这些

受到雌激素调节的主要细胞因子包括促进骨吸收的 IL-1、TNF- α 和 IL-6 雌激素可以抑制他们的产生;此外,雌激素可以增加促进骨形成的 TGF 的产生。最近有体外研究表明雌激素可以促进 OPG 的生成^[8],但是在体内的情况报道较少。在本研究中观察到的雌激素可以逆转去卵巢后 RANKL 表达上升和 OPG 表达下降,与体外实验的结果一致。同时去卵巢后其他细胞因子尤其是 TNF- α 和 IL-6 表达增高可能也是导致上述基因表达异常的重要原因。因此在体内雌激素影响 OPG、RANKL 的作用是通过影响其他细胞因子还是直接作用于成骨/基质细胞发挥的,还有待于进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] 曾天舒,陈璐璐,夏文芳,等.大鼠去卵巢后骨髓源性破骨细胞形成的动态变化及其与骨髓 IL-6、IL-6 受体表达的关系.中国骨质疏松杂志,2003,9:291-294.
- [2] Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of Osteoclast differentiation. Endocr Rev, 1992, 13:66-87.
- [3] Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, et al. Role of rank ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. J Clin Invest, 2003, 111(8):1120-1122.
- [4] Hofbauer LC. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. J Bone Miner Res, 2000, 15:2-12.
- [5] Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , but not IL-6 stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. Bone, 1999, 25:255-259.
- [6] Lam J, Takeshita S, Barker JE, et al. TNF induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. J Clin Invest, 2000, 106:1480-1488.
- [7] Compton JE. Sex Steroids and Bone. Physiol Rev, 2001, 81:419-447.
- [8] 苏欣,廖二元,朱旭萍,等.雌二醇对人成骨细胞护骨素、护骨素配体及其相关因子的调节.中华老年医学杂志,2004,23:153-156.

(收稿日期 2005-04-26)