

雄激素对大鼠胎颅盖骨成骨细胞雌激素受体基因表达的影响

李孝鹏 邹志强 朱雅萍 王君 符诗聪

摘要:目的 通过研究雄激素(十一酸睾酮)对成骨细胞雌激素受体基因表达的影响,探讨雄激素对成骨细胞增殖和分化的调控机制。方法 通过对体外培养的胎鼠颅盖骨成骨细胞实施含 10^{-10} mol/L、 10^{-9} mol/L、 10^{-8} mol/L 三种浓度雄激素的培养液干预,采用 RT-PCR 的方法半定量观察成骨细胞中雌激素受体基因 mRNA 表达的变化,用以分析雄激素对成骨细胞中雌激素受体的影响,并进而探讨雄激素对成骨细胞的影响。结果 实验选用的各浓度组均未出现细胞毒性反应,雄激素干预使成骨细胞中雌激素受体 α 基因表达上调,而雌激素受体 β 基因表达轻微下调。结论 雄激素可以特异性地在转录水平调节成骨细胞中雌激素受体基因的表达。

关键词: 雄激素;成骨细胞;雌激素受体 α 基因;雌激素受体 β 基因;RT-PCR

Regulation of gene expression of estrogen receptor (histomorphometry) in osteoblasts by androgen in fetal cranium of rats LI Xiaopeng, ZOU Zhiqiang, ZHU Yaping, et al. Institute of Forensic Science, Ministry of Justice, Shanghai 200063, China

Abstract: **Objective** To clarify the mechanism of regulation of androgens (testosterone undecanoate) on osteoblast and to characterize the mechanism of cellular and molecular actions of androgens on cranium with *in vitro* osteoblast culture models. **Methods** Mice osteoblasts were prepared from the cell culture model. Androgen was prepared to yield final concentrations of 10^{-10} mol/L, 10^{-9} mol/L and 10^{-8} mol/L and then applied to osteoblast models. The mRNA expressions of estrogen receptor (ER)- α and ER- β were semi-quantified by RT-PCR. **Results** No cellular toxicity was found in any concentrations applied in the experiments. The expression of ER- α mRNA increased significantly in a dose and time dependent pattern after administration of androgen, while the mRNA expression of ER- β was insignificantly decreased. **Conclusions** Androgen up-regulates the expression of ER- α mRNA in osteoblasts.

Key words: Androgen; Osteoblastic-like cells; ER- α ; ER- β ; RT-PCR

在人类多种骨细胞包括成骨细胞、骨髓基质干细胞、骨细胞、肥大软骨细胞和破骨细胞中,均检测到雌激素受体和雄激素受体的存在。明确说明骨是雌激素和雄激素的直接靶组织。成骨细胞作为骨组织的重要细胞,在骨代谢中具有重要的地位。而雄激素和雌激素对骨形成甚至骨吸收的影响,主要是通过影响成骨细胞来发挥作用的。作为雄激素和雌激素的共同的靶细胞,在探讨雄激素对骨作用的机制时,对雄激素干预后成骨细胞内雌激素受体基因表达的变化进行分析就具有明确的意义。本部分实

验即是通过对外培养的胎鼠颅盖骨成骨细胞实施雄激素干预,观察比较成骨细胞中雌激素受体基因 mRNA 表达的变化,用以分析雄激素对成骨细胞中雌激素受体的影响,并初步探讨成骨细胞核受体的调控与影响。

1 材料和方法

1.1 试剂和器材

1.1.1 试剂: DMEM 培养基及胎牛血清(GIBCO 公司,批号:041030),II 型胶原酶及胰蛋白酶(SIGMA 公司,1:250),缓冲液(D-Hanks),青霉素(上海先锋药业有限公司,批号:030602),链霉素(上海四药有限公司,批号:020604),十一酸睾酮(南京欧家农公司,批号:AA-1702-10),PERKIN ELMER 2400 PCR 扩

作者单位:200025 上海,上海市伤骨科研究所(李孝鹏、邹志强、朱雅萍、王君);上海交通大学医学院附属瑞金医院伤科(符诗聪)

通讯作者:符诗聪,Email: fushicong@medmail.com.cn

增仪(型号:Gene Amp PCR system 2400),天能全自动数码凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司,型号:GIS-2019),smartspec™ 3000 型光谱分析仪(BIO-RAD,USA)。

1.1.2 材料:无菌手术剪、锥形瓶、培养皿、ESPELBNA-311 二氧化碳培养箱、Olympus BH-1 倒置显微镜、NUNC 25 cm² 培养瓶、过滤器。

1.2 实验方法

1.2.1 血清制备及成骨细胞培养:胎鼠颅盖骨成骨细胞通过酶消化法从 SD 大鼠[上海斯莱克实验动物有限公司,许可证编号:SYXK(沪). 2002-0002]胎鼠颅盖骨分离得到。将离心后沉淀的细胞团块用培养液制成细胞悬液,并将获得的细胞混匀,接种于培养瓶,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,24 h 左右换液 1 次,以后每 2 ~ 3 d 换液 1 次直至 80% 细胞融合。选择第二代细胞用于实验。

1.2.2 胎鼠颅盖骨成骨细胞鉴定及体外形态学观察:采用四环素标记法观察成骨细胞矿化结节鉴定成骨细胞表型表达情况,操作如下:培养瓶中加入四环素(50 μg/mL 培养液)进行标记,更换新鲜培养液继续培养,PBS 液冲洗,再经 95% 乙醇固定,荧光显微镜观察,拍照。用倒置显微镜进行体外培养的胎鼠颅盖骨成骨细胞形态学观察。

1.2.3 细胞干预 (1)雄激素(十一酸睾酮)干预液准备:使用前,将(十一酸睾酮)加入培养液并进一步稀释成 10⁻¹⁰ mol/L、10⁻⁹ mol/L、10⁻⁸ mol/L 3 种实验浓度的干预液。(2)将实验细胞常规消化后,制备细胞悬液,计数,以 2 × 10⁴ 个/cm² 接种于 NUNC 25 cm² 培养瓶,随机分为药物干预组与空白对照组,每组 3 瓶,共 15 瓶。(3)细胞在 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 的条件下培养 48 h,然后饥饿培养细胞 24 h,准备雄激素干预。(4)干预组细胞用含上述浓度雄激素的干预液换液,进行细胞干预,并分别于干预后 8、24、72 h 收集细胞。不含雄激素的无血清培养液换液用于对照组。

1.2.4 成骨细胞总 RNA 的抽提 (1)均质化:细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化 2 min,收集于离心管中,2000 rpm 离心、洗涤,离心 2 次,室温下静置 5 min;(2)分离:每个离心管中加入氯仿 0.4 mL,经剧烈振荡,室温下静置。再离心 15 min。取上层无色液相;(3)RNA 沉淀:将上层无色液相中加入 1 mL 异丙醇,室温下静置再离心,弃上清,沉淀即为 RNA。(4)RNA 洗涤:每个离心管中加入 75% 乙醇 4 mL,离心 5 min。(5)RNA 溶解:旋转蒸发仪中干燥,加 50 μL

DEPC 处理过的水溶解 RNA, - 20℃ 保存。(6)RNA 浓度测定:用紫外分光光度计测定 260 nm 波长下 OD 值定量,换算出总 RNA 浓度,各取 2 μg RNA 进行反转录。

1.2.5 RT-PCR 扩增特异基因片段:RT-PCR 反应体系按试剂盒操作说明进行。各基因引物序列、退火温度见表 1。

表 1 基因引物序列及其他参数

基因	引物序列	AT(℃)	大小(bp)
ERα	5'- GGCTGGGCCAAGAAAATCC-3'	58.7	440
	5'- TTGCCACAGACGGACTGACTG-3'		
ERβ	5'- TCGCCGGCTGCCACTTACCA-3'	64.2	446
	5'- AGGCGCTGGGCTCGTTCTCC-3'		
β-actin	5'- GACCTGACAGACTACCTCAT-3'	60	350
	5'- AGACAGCACTGTGTTGGCAT-3'		

注:AT 退火温度 Size 产物大小

(1)mRNA 逆转录:使用 QIAGEN 逆转录试剂盒(Omniscript™ Reverse Transcriptase for cDNA synthesis),在冰浴的微量离心管中加入 10 × Buffer RT 2.0 μL, dNTP 2.0 μL, Oligo-dT 引物 2.0 μL, RNA 酶抑制剂 1.0 μL, 逆转录酶 1.0 μL, DEPC 水 12 μL, 共 20 μL。置于 ASTEC BI-525 恒温孵育器中,37℃ 60 min,93℃ 5 min,立即 4℃ 保存。

(2)PCR 扩增:在微量离心管中加入 DEPC 水 16 μL,10 × 缓冲液 3 μL, dNTP 2 μL, 25 mM MgCl₂, 引物各 1 μL, cDNA 2 μL, Taq 酶 2.5 μL, 共 30 μL。使用 PERKIN ELMER 2400 PCR 扩增仪,95℃ 预变性 10 min,95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,共 35 个循环。

(3)电泳观察结果:扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 1.5 h,所得图象在天能凝胶图象分析系统进行扫描,GFS 1500-A 软件分析,分别计算个目标基因与 β-action 基因吸收峰(峰面积 × 密度)比值,比较各组间吸收峰比值的大小。

1.2.6 统计学处理

所有实验操作重复 3 次,结果以均数 ± 标准差表示,使用 SPSS 11.0 软件对数据进行配对 t 检验。

2 结果

2.1 培养的成骨细胞形态学观察

接种后的成骨细胞在倒置显微镜下呈典型类上皮细胞外观,大多数表现为梭形和多角形,细胞突触长,细胞间胞突相互连接,胞质透明,细胞核较大,原代细胞生长活跃,细胞分裂象多见(见图 1)。原代成骨细胞多于 1 周时间铺满瓶壁,并在此后陆续出

现矿化结节 ,四环素荧光染色后在荧光显微镜下呈金色结节状 (图 2)。传代后细胞生长更为活跃。不

同浓度的雄激素干预培养液加入后 ,成骨细胞形态未见明显变化。



图 1 倒置显微镜下的小鼠胎鼠成骨细胞
梭形和多角形多见,细胞突起长,细胞
间相互连接 ×200

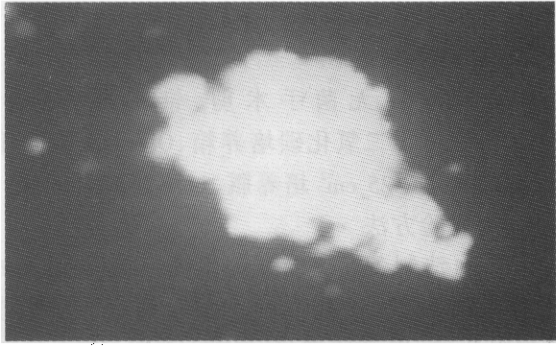
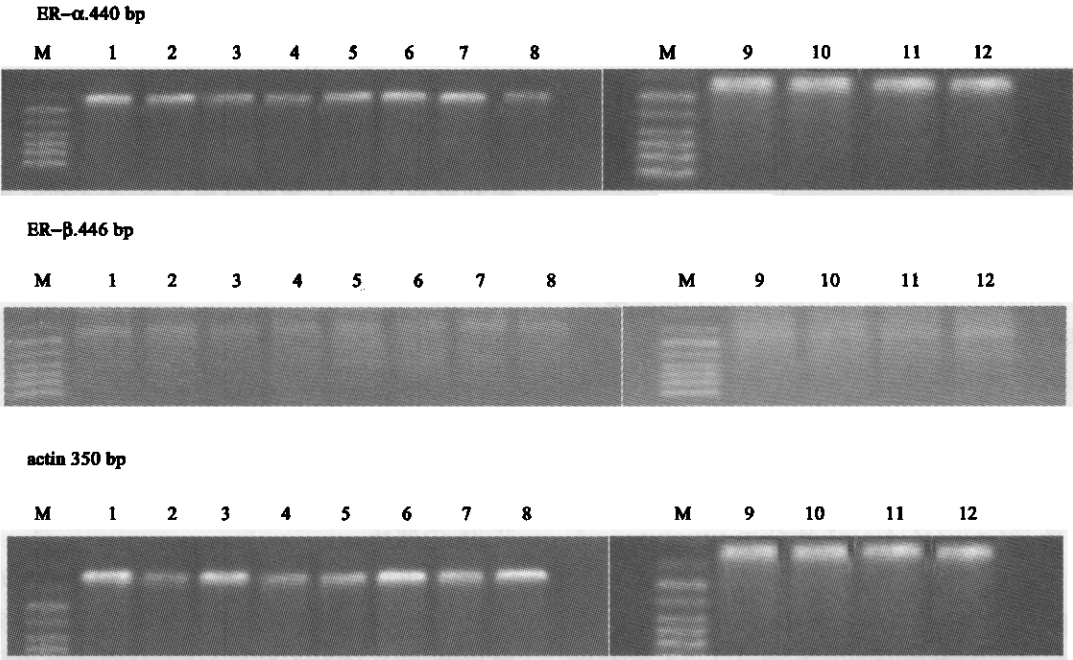


图 2 成骨细胞部分钙化结节体积较大,
四环素荧光染色后在荧光显微镜下呈金
色结节状 ×400



Lane1:雄激素浓度 10^{-8} mol/L 24h; Lane2:雄激素浓度 10^{-9} mol/L 24 h; Lane3:雄激素浓度 10^{-10} mol/L 24 h; Lane4:空白对照 24 h; Lane5:雄激素浓度 10^{-8} mol/L 72 h; Lane6:雄激素浓度 10^{-9} mol/L 72 h; Lane7:雄激素浓度 10^{-10} mol/L 72 h; Lane8:空白对照 72 h; Lane9:雄激素浓度 10^{-8} mol/L 12 h; Lane10:雄激素浓度 10^{-9} mol/L 12 h; Lane11:雄激素浓度 10^{-10} mol/L 12 h; Lane12:空白对照 12 h; Lane M: Maker

图 3 RT-PCR 检测不同浓度雄激素干预后成骨细胞 ER α 和 ER β 基因 mRNA 表达情况

表 2 雄激素干预成骨细胞雌激素 α 与
雌激素 β 基因 mRNA 的表达

时间	基因	控制组	10^{-8} mol/L	10^{-9} mol/L	10^{-10} mol/L
12h	ER- α	0.587 $\pm$ 0.027	0.673 $\pm$ 0.036	0.682 $\pm$ 0.049	0.691 $\pm$ 0.067*
	ER- β	0.187 $\pm$ 0.045	0.135 $\pm$ 0.039	0.147 $\pm$ 0.032	0.153 $\pm$ 0.043
24 h	ER- α	0.501 $\pm$ 0.045	0.897 $\pm$ 0.027**	0.796 $\pm$ 0.046**	0.693 $\pm$ 0.039*
	ER- β	0.164 $\pm$ 0.038	0.158 $\pm$ 0.047	0.149 $\pm$ 0.036	0.138 $\pm$ 0.036
72 h	ER- α	0.554 $\pm$ 0.036	0.823 $\pm$ 0.041**	0.890 $\pm$ 0.037**	0.861 $\pm$ 0.057**
	ER- β	0.201 $\pm$ 0.046	0.160 $\pm$ 0.036*	0.143 $\pm$ 0.046	0.167 $\pm$ 0.027*

注 :与对照组相比* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与对照组

2.2 雄激素干预对胎小鼠体外培养成骨细胞雌激素受体基因 mRNA 表达的影响(图 3 表 2)。

2.2.1 雌激素受体(ER)在体外培养胎小鼠成骨细胞表达情况 :在培养的胎小鼠成骨细胞中均检测到 ER α 和 ER β 基因的 RT-PCR 产物 ,其中 ER β 的表达比较弱。

2.2.2 雄激素干预后成骨细胞雌激素受体 mRNA 表达的情况 :含不同浓度雄激素的干预培养液培养

不同时相的成骨细胞 ,细胞 $ER\alpha$ 基因随时间延长 , mRNA 表达增强 ,显著性也增加 , $ER\beta$ 基因随时间变化无明显变化趋势 ,但与对照组比较仍有较明显的减弱。

在不同浓度雄激素培养液的干预下 , $ER\alpha$ 基因随雄激素浓度呈递增改变 ,但变化并不十分显著 ; $ER\beta$ 基因在浓度递增时无明显变化趋势 ,与对照组比较有较明显的减弱。

3 讨论

在本试验中 ,体外培养的胎小鼠成骨细胞中均检测到 $ER\alpha$ 和 $ER\beta$ 基因的 RT-PCR 产物 ,其中 $ER\beta$ 的表达比较弱。同时发现雄激素作用于体外培养的胎小鼠成骨细胞后 ,能增加该细胞 $ER\alpha$ 基因的表达 ,并且随作用时间的增加 ,表达增强 ,而随浓度的递增无明显变化 ;对 $ER\beta$ 基因的表达则有一定的抑制作用。

目前已初步了解 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 在骨组织均存在但分布不同 ,但对其各自的作用机制尚不清楚。有研究发现 ,在雄性小鼠体内 ,在骨生长和发育的过程中 ,雌激素的作用主要是由 $ER\alpha$ 来介导而不是 $ER\beta$ ^[1]。我们的结果发现雄激素作用于体外培养的胎小鼠成骨细胞后 ,能增加该细胞 $ER\alpha$ 基因的表达 ,对 $ER\beta$ 基因的表达则有一定的抑制作用。

雄激素对骨代谢的临床和生化影响已有了较好的评价^[2] ,目前认为 ,雄激素对骨具有直接和间接两种作用 ,除了直接作用于骨组织的靶细胞 ,雄激素可在外周组织中转化成雌激素来发挥对骨的作用。在本试验中 ,雄激素主要是通过直接作用于成骨细胞来发挥作用 ,表明雄激素可以通过直接作用于成骨细胞 ,对成骨细胞中雌激素受体表达产生影响 ,并调控或影响细胞对雌激素的活性 ,从而对成骨细胞的

功能产生影响 ,但其影响机制及方式仍有待于进一步研究。

在不同种系、不同来源的成骨细胞中 $ER\alpha$ 和 $ER\beta$ 的表达及作用存在很大差异。Arts 等^[5]观察到人成骨细胞培养期 $ER\beta$ 表达逐渐增强 ,而 $ER\alpha$ 的表达则变化不大 ,并由此推测 $ER\beta$ 在成骨细胞中的作用略大于 $ER\alpha$;Bord 等^[6]发现 $ER\beta$ 在人的松质骨表达强烈 , $ER\alpha$ 表达水平较低。由于 $ER\alpha$ 在培养的人成骨细胞中表达拷贝数较少 ,所以未检测到 $ER\alpha$ mRNA 的 RT-PCR 产物 ;因此 ,雄激素对人成骨细胞中雌激素受体是否产生影响 ,及有何影响 ,仍需进一步研究。

【 参 考 文 献 】

- [1] Olle V , Marie KL , Karin H , et al. Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2000 , 97 :5474-5479.
- [2] Lorenz CH , Sundeeep K. Androgen effects on bone metabolism : recent progress and controversies. *European Journal of Endocrinology* , 1999 , 140 :271-286.
- [3] McDonnell DP , Norris JD. Analysis of the molecular pharmacology of estrogen receptor agonists and antagonists provides insights into the mechanism of action of estrogen in bone. *Osteoporosis International* , 1997 , 7 (Suppl 1) : S29-S34.
- [4] Aarnisalo P , Palvimo J , Janne OA. CREB-binding protein in androgen receptor-mediated signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* , 1998 , 86 :854-857.
- [5] Arts J , Kuiper G , Janssen J , et al. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cell. *Endocrinology* , 1997 , 138 :5067-5070.
- [6] Bord S , Horner A , Beavan S , et al. Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 , 86 :2309-2314.

(收稿日期 :2005-09-22)