·论著·

外源性 PTH 对摘卵大鼠骨髓 PPARγ mRNA 表达的影响

金慰芳 丰盛梅 顾淑珠 高建军 周轶 王洪复

摘要：目的 观察骨质疏松大鼠骨髓微环境 PPARγ mRNA 表达变化和 PTH 治疗绝经后骨质疏松症的分子机制。**方法** 雌性大鼠随机分为 Sham、OVX 和 OVX + $PTH_{(1-34)}$ 20 μg 组，摘卵 12 周后给药，药后 8 周处死，观察骨髓脂肪细胞及 PPARγ mRNA 表达变化。**结果** OVX 组大鼠腰椎骨髓腔内脂肪空泡数较 Sham 组明显增加（$P < 0.001$），空泡百分面积为 Sham 组的 26.81 倍（$P < 0.001$）。OVX + PTH 20 μg 组的脂肪空泡数明显减少（$P < 0.001$），仅为 OVX 组的 18.7%（$P < 0.001$）；OVX 组骨髓 PPARγ mRNA 表达较 Sham 组明显升高（$P < 0.05 \sim 0.001$），OVX + $PTH_{(1-34)}$ 20 μg 组 PPARγ mRNA 表达则较不治疗组明显降低（$P < 0.05 \sim 0.01$）。**结论** OVX 骨质疏松大鼠骨髓微环境 PPARγ mRNA 表达上调，PTH 对骨质疏松的促进骨形成作用与其抑制骨髓 PPARγ mRNA 表达有关。

关键词：重组人甲状旁腺激素$_{(1-34)}$；骨质疏松；过氧化物酶体增殖物激活受体 γ

Effects of PTH on the expression of bone marrow PPARγ mRNA in ovariectomized rats *JIN Wei-fang, FENG Sheng-mei, GU Shu-zhu, et al. Department of Bone Metabolic, Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai* 200032, China

Abstract: Objective To investigate the alteration of PPARγ mRNA expression in the microenvironment of bone marrow in ovariectomized rats and the molecular mechanism about the effect of PTH on postmenopausal osteoporosis. **Methods** Female rats were randomly allocated to Sham, OVX and OVX + $PTH_{(1-34)}$ 20 μg groups and PTH was given 12 weeks after OVX. The adipocytes and the expression of PPARγ mRNA were determined at the 8th week after medication when the rats were killed. **Results** The fat vacuoles in lumbar vertebrae in the OVX group were 26.81 times more than those of the Sham group ($P < 0.001$), while the fat vacuoles in the OVX + $PTH_{(1-34)}$ group were significantly reduced which was only 18.7% of the value in the OVX group ($P < 0.001$). The expression of PPARγ mRNA in the OVX group increased significantly ($P < 0.05 \sim 0.01$) than that of the Sham group, while that of the OVX + $PTH_{(1-34)}$ group was significantly reduced ($P < 0.05 \sim 0.01$). **Conclusions** The PPARγ mRNA expression in bone marrow of OVX rats is increased, and the stimulating effect of PTH on bone formation is related to its inhibition on the expression of the PPARγ mRNA.

Key words: $rhPTH_{(1-34)}$; Osteoporosis; PPARγ

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（peroxisome proliferator-activated receptor γ，PPARγ）是调节骨髓间充质干细胞（mesenchymal stem cell，MSC）向成骨细胞或脂肪细胞分化过程中重要转录因子之一。绝经后骨量减少的同时常伴随骨髓脂肪形成增加。小剂量间隙甲状旁腺激素（parathyroid hormone，PTH）促进骨转换、显著增加骨量与骨强度已为许多研究证实，其机理尚不完全清楚。本研究从骨髓前体细胞分化调节角度观察大鼠摘卵后雌激素水平下降及 PTH 干预后骨髓细胞 PPARγ 表达水平的变化，旨在探讨 PTH 骨形成促进作用的可能分子机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

$rhPTH_{(1-34)}$（ZT 生物工程有限公司 25 μg/支，批号：2003408）；TRIzol（Gibco BRL）；DEPC（上海生物工程有限公司）；RT 逆转录与 PCR 扩增试剂盒为 Sangon 产品。双能 X 线骨密度仪（LUNAR DXP-L，

作者单位：200032 上海，复旦大学放射医学研究所骨代谢研究室

通讯作者：金慰芳，Email：jinwf@shmu.edu.cn

USA)；万能材料测试仪(INSTRON 5543，USA)；形态计量软件(Mediaplayer Image-Pro Plus IPP，USA)。

1.2 动物与分组

清洁级 SD 雌性大鼠 58 只，6 月龄，体重 230～270 g。随机分为摘卵(OVX 36 只)与假摘卵(Sham 22 只)组。氯胺酮腹腔注射麻醉，OVX 组背侧切口作双侧卵巢摘除，Sham 组背部切口不摘除双侧卵巢，仅切除卵巢周围少量脂肪组织。常规饲养。然后将大鼠分为 Sham(22 只)、OVX(22 只)和 OVX + PTH 20 μg(14 只)组。Sham 与 OVX 组于术后 12 周起给予 NS 0.1 ml/d 皮下注射；OVX + PTH 组于手术后 12 周起给予 20 μg/kg/d $rhPTH_{(1-34)}$ 皮下注射，每天一次、每周 6 次给药，共 8 周。

1.3 观察指标

1.3.1 骨量、骨强度与骨微结构：于 PTH 给药 8 周后，每组 10 只大鼠颈动脉放血处死，取一侧股骨与腰椎(L_{1-5})分别在双能 X 线骨密度仪上进行骨密度测试，结果以 g/cm^2 表示；然后分离腰椎，取腰椎 3 与另侧股骨在万能材料测试仪上进行压缩与三点弯曲最大载荷测试，结果以牛顿力(N)表示；取腰椎 4 脱钙后常规石蜡包埋切片 HE 染色，光镜下观察骨微结构，并用形态计量软件进行骨小梁形态计量测试，结果以面积百分比(%)表示。

1.3.2 骨髓脂肪含量：上述腰椎 4 切片标本，光镜下观察骨髓腔脂肪空泡数及面积，IPP 形态计量软件测算脂肪空泡与骨髓腔面积比值，结果以%表示。

1.3.3 骨髓细胞 PPARγ mRNA 表达：于切卵术后 1 周、12 周和 PTH 给药 1 周、8 周后每组取 4 只大鼠，以 11%乌拉坦麻醉后无菌取下股骨，用培养液冲出骨髓，反复吹打成细胞悬液，离心(1000 rpm × 5 min)，细胞沉淀置冰浴中抽提总 RNA。

表 1 骨髓细胞 PPARγ 基因 PCR 引物序列

基因	上游引物	下游引物	产物(l_{bp})
GAPDH	5′-CGTGGAGTCTACTGGCGTCT-3′	5′-TCCTCAGTGTAGCCCAGGAT-3′	553
PPARγ	5′-ATGGTTGACACAGAGATGCCA-3′	5′-GAATAATAAGGCGGGGACG-3′	339

1.3.4 统计学处理：数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 软件建立数据文件，两组均数比较采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 骨量、骨强度及骨微结构变化

表 2 显示，OVX 组大鼠的股骨与腰椎骨密度、股骨三点弯曲载荷与腰椎压缩载荷及骨小梁百分面积均较 Sham 组明显下降($P < 0.05 \sim 0.001$)；OVX + PTH 组的上述指标均较 OVX 对照组显著增加($P < 0.01 \sim 0.001$)。

表 2 各组大鼠骨量、骨生物力学和骨微结构指标测定结果($\bar{x} \pm s$，$n = 10$)

测定指标	Sham	OVX	OVX + PTH
股骨 BMD(g/cm^2)	$0.306 \pm 0.029^{**}$	0.269 ± 0.015	$0.314 \pm 0.013^{***}$
腰椎 BMD (L_{1-5})(g/cm^2)	$0.309 \pm 0.019^{***}$	0.255 ± 0.021	$0.319 \pm 0.010^{***}$
股骨三点弯曲最大载荷(N)	$190.9 \pm 15.8^{*}$	175.2 ± 15.7	$204.7 \pm 21.1^{**}$
腰椎压缩最大载荷(N)	$496.3 \pm 61.4^{*}$	405.7 ± 86.3	$549.7 \pm 83.9^{**}$
L_3 骨小梁百分面积(%)	$32.6 \pm 5.9^{***}$	22.0 ± 3.6	$42.8 \pm 7.0^{***}$

注：与 OVX 组比较：$^{*}P < 0.05$；$^{**}P < 0.01$；$^{***}P < 0.001$；N 为牛顿力

2.2 骨髓腔脂肪含量的变化

大鼠腰椎石蜡切片 HE 染色显示(见图 1)，OVX 组骨髓腔内脂肪空泡数量比 Sham 组明显增加($P < 0.001$)，脂肪空泡面积占骨髓腔面积的百分比明显高于 Sham 组，为 Sham 组的 26.81 倍($P < 0.001$)；OVX + PTH 组脂肪空泡数量明显减少($P < 0.001$)，脂肪空泡面积占骨髓腔面积的百分比明显低于 OVX 组，仅为 OVX 组的 18.7%($P < 0.001$，表 3)。

表 3 骨髓腔内脂肪空泡数量及其面积与骨髓腔面积的比值(%)($\bar{x} \pm s$)($n = 10$)

组别	Sham	OVX	OVX + PTH
数量	$2.3 \pm 2.6^{***}$	31.7 ± 11.7	$7.4 \pm 3.3^{***}$
比值	$0.013 \pm 0.018^{***}$	0.370 ± 0.134	$0.069 \pm 0.026^{***}$

注：与 OVX 组比较$^{***}P < 0.001$

2.3 骨髓细胞 PPARγ 的表达变化

表 4 显示，大鼠，OVX 组摘卵后 1 周 PPARγ mRNA 表达水平与 Sham 组比较二者无显著差异，而术后 12、13 和 20 周表达水平均比 Sham 组明显升高($P < 0.05 \sim 0.001$)。OVX 大鼠给予 $rhPTH_{(1-34)}$ 药后 1 周和 8 周，骨髓细胞的 PPARγ mRNA 表达水平均较不给药对照组明显降低($P < 0.05 \sim 0.01$)，药后 8 周降低幅度较药后 1 周增大($P < 0.01$)。

表 4 各组大鼠骨髓细胞 PPARγ 表达水平(PPARγ/GAPDH)($\bar{x} \pm s$)($n = 4$)

摘卵时间(周)	Sham	OVX	OVX + PTH
1	1.357 ± 0.13	1.417 ± 0.227	
12	$1.124 \pm 0.1^{**}$	1.814 ± 0.244	
13	$0.797 \pm 0.176^{***}$	2.09 ± 0.845	$1.418 \pm 0.148^{**}$(药后 1 周)
20	$0.615 \pm 0.18^{*}$	0.965 ± 0.106	$0.452 \pm 0.231^{*}$(药后 8 周)

注：与同时相 OVX 组比较$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$

3 讨论

卵巢功能减退、雌激素水平不足引起骨转换增加、骨吸收大于骨形成，导致骨量丢失、骨微结构破

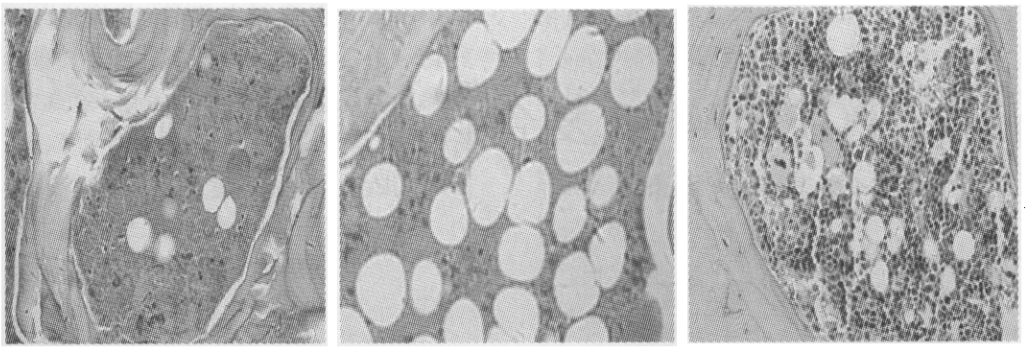

图 1 腰椎(L_4)骨髓腔脂肪空泡形态改变(200×,HE)

坏及骨强度下降是绝经后骨质疏松的主要发病机制。近年来,PTH 以其显著的骨形成促进作用引起研究者的重视。研究表明间歇给予 PTH 能增加骨量,改善骨微结构,增加骨强度[1,2],但其机制尚不明确。有研究报道,摘卵引起的骨丢失常伴有骨髓脂肪组织的增加[3];PTHrP 杂合小鼠小梁骨量减少,同时伴骨髓脂肪增加[4]。因此,摘卵及 PTH 干预后骨髓脂肪与骨量的变化之间可能存在一定关联。成骨细胞和脂肪细胞共同来源于骨髓 MSC[5,6],这两种细胞系之间存在很大程度的可塑性[7,8]。PPAR-γ 2 是脂肪细胞分化的早期标志[9,10],其表达增加可能是 MSC 向脂肪细胞形成增加和向成骨细胞形成减少的动力。流行病学研究表明 PPARγ 参与了绝经后骨丢失[11],也有报道雌激素影响骨髓 MSC 向成骨细胞和脂肪细胞分化和/或功能[12,13]。

本研究结果显示,摘卵后组大鼠的股骨与腰椎骨密度、股骨三点弯曲载荷与腰椎压缩载荷及骨小梁百分面积均较假摘卵组明显下降($P < 0.05 \sim 0.001$);$rhPTH_{(1-34)}$ 给药 8 周后上述指标均较摘卵不给药组明显增加($P < 0.01 \sim 0.001$),表明了摘卵模型的成立与 PTH 的骨形成药效作用。大鼠摘卵后骨量丢失,骨小梁变细、数量下降、骨髓腔增大,同时骨髓腔内脂肪细胞数较假摘卵组大鼠显著增加($P < 0.001$),脂肪空泡面积占骨髓腔面积的百分比也较假摘卵组大鼠显著增高($P < 0.001$);给予 $rhPTH_{(1-34)}$ 治疗后,骨小梁增粗,数量增加,骨髓腔变小,同时骨髓腔内脂肪细胞数较摘卵组明显减少($P < 0.001$),脂肪空泡面积占骨髓腔面积的百分比明显比摘卵组显著降低($P < 0.001$)。表明摘卵后骨量丢失与骨髓中脂肪形成增加密切相关,而 PTH 的疗效可能部分与其抑制骨髓脂肪形成从而增加骨形成有关;另外研究结果显示,摘卵后 1 周时大鼠骨髓细胞 PPARγ mRNA 表达水平与假摘卵对照组比较无显著差异,而摘卵后 12、13 及 20 周时摘卵组大鼠的 PPARγ mRNA 表达水平均比假摘卵组明显升高($P < 0.05 \sim 0.001$)。本研究结果与文献关于 17 β-estradiol(E_2)通过雌激素受体(estrogen receptor, ER)下调 PPARγ 2 mRNA 的表达,刺激前体细胞分化为成骨细胞,同时抑制其脂肪细胞形成的结果相一致[12]。PTH 治疗后 PPARγ mRNA 表达水平显著下降($P < 0.05 \sim < 0.01$),进一步表明外源性 PTH 干预可下调 PPARγ 表达水平,抑制 MSC 向脂肪细胞方向的分化,从而导致 MSC 向成骨细胞方向分化增加[14],认为可能是 PTH 有效治疗绝经后骨质疏松症的分子机制之一,其确切机理尚待进一步研究证实。

【参考文献】

[1] 王洪复,金慰芳,高建军.重组人甲状旁腺激素$_{(1-34)}$对去卵巢大鼠骨质疏松的治疗作用.中国医学科学院学报,2003,25(3):275-279.

[2] Hock JM, Gera I. Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of the anabolic response of bone to parathyroid hormone. J Bone Miner Res,1992, 7(1):65-72.

[3] Benayahu D, Shur I, Ben-Eliyahu S. Hormonal changes affect the bone and bone marrow cells in a rat model. J Cell Biochem,2000,79(3):407-415.

[4] Amizuka N, Karaplis AC, Henderson JE, et al. Haploinsufficiency of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) results in abnormal postnatal bone development. Dev Biol,1996, 175(1):166-176.

[5] Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. Clin Orthop Relat Res,1989, 240:270-280.

[6] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science,1999, 284(5411):143-147.

(下转第 638 页)

（上接第 549 页）

[7] Nuttall ME, Patton AJ, Olivera DL, et al. Human traebecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: Implications for osteogenic disorders. J Bone Miner Res, 1998, 13(3): 371-382.

[8] Park SR, Oreffo RO, Triffitt JT. Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes *in vitro*. Bone, 1999, 24(6): 549-554.

[9] Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000, 16: 145-171.

[10] Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. Endocr Rev, 1999, 20(5): 649-688.

[11] Ogawa S, Urano T, Hosoi T. Association of bone mineral density with a polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene: PPAR gamma expression in osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 260(1): 122-126.

[12] Spelsberg TC, Subramaniam M, Riggs BL, et al. The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. Mol Endocrinol, 1999, 13(6): 819-828.

[13] Schiller PC, D'Ippolito G, Brambilla R, et al. Inhibition of gap-junctional communication induces the trans-differentiation of osteoblasts to an adipocytic phenotype *in vitro*. J Biol Chem, 2001, 276(17): 14133-14138.

[14] 金慰芳，于志锋，高建军，等. PTH 对骨髓细胞骨代谢相关基因表达的影响. 中国骨质疏松杂志，2005，11(3)：14-17.

（收稿日期：2006-04-16）