

雷洛昔芬上调卵巢切除大鼠腰椎护骨素 mRNA 的表达

商敏 杨欣 李亚珍 顾蓓 吴琼 廖秦平

摘要:目的 建立绝经后骨质疏松 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 的大鼠模型, 研究雷洛昔芬 (raloxifene, RLX) 对卵巢切除大鼠腰椎组织中护骨素 (OPG) 基因 mRNA 表达水平的影响, 探讨其治疗 PMOP 的作用机制。方法 6 月龄未交配健康雌性 SD 大鼠 40 只, 随机分为假手术 (SHAM) 组, 卵巢切除 (OVX) 组, OVX + 戊酸雌二醇 (E_2) 组和 OVX + RLX 组。灌胃 13 周后处死动物, 第四腰椎行骨组织形态计量指标测定, 第二腰椎采用 RT-PCR 方法, 对 OPG mRNA 表达水平进行检测。结果 OVX 组大鼠较 SHAM 组骨小梁体积百分比 (TBV%) 显著下降, 类骨质体积百分比 (OSV%) 明显升高 ($P < 0.05$); E_2 和 RLX 组大鼠的 TBV% 明显升高, OSV% 明显下降; OPG mRNA 表达水平在 OVX 大鼠组织中下调, 与 SHAM 组相比有显著性差异 ($P < 0.05$), E_2 和 RLX 均可上调 OVX 大鼠骨组织 OPG mRNA 表达水平 ($P < 0.05$)。结论 实验成功制造了大鼠 PMOP 模型; E_2 和 RLX 均可抑制骨转换; PMOP 的发生与 OPG 有关, RLX 和 E_2 一样, 其抗骨吸收效应很可能是通过 OPG 介导的。

关键词: 绝经后骨质疏松; 大鼠; 护骨素; 雷洛昔芬

Raloxifene up-regulates the mRNA expression of osteoprotegerin in the lumbar vertebra of ovariectomized rats SHANG Min, YANG Xin, LI Yazhen, et al. Department of Gynecology and Obstetrics, Beijing Friendship Hospital, Beijing 100095, China

Abstract: **Objective** To establish a postmenopausal osteoporotic model of rats and investigate the effect of raloxifene (RLX) on the expression of OPG mRNA in lumbar vertebra of ovariectomized rats, and to analyze its mechanism in the prevention of postmenopausal osteoporosis. **Methods** Forty female rats of 6-month-old were randomly allocated into 4 groups: sham operated group, ovariectomized group (OVX), ovariectomized + valerate estradiol group (OVX + E_2), and ovariectomized + raloxifene group (OVX + RLX). All rats were sacrificed after lavaged for 13 weeks. The fourth lumbar vertebra was dissected for histomorphology and the second lumbar vertebra for measurement of OPG mRNA by reverse transcription polymerase chain reaction technique. **Results** The trabecular volume% was significantly lower in the OVX group than that in the SHAM group, while the ostoid seam% was significantly higher ($P < 0.05$). The trabecular volume% was increased and ostoid seam% was reduced in OVX + E_2 group and OVX + RLX group. Compared with the SHAM rats, the OPG mRNA level was decreased significantly in the OVX group ($P < 0.05$), and E_2 and RXL up-regulated the expression of OPG mRNA significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** The rat model of postmenopausal osteoporosis is successfully established. Valerate estradiol and RXL can inhibit bone turnover. OVX-induced bone loss is associated with OPG. Raloxifene, as well as valerate estradiol, might have anti-resorption effect on bone mediated by OPG.

Key words: Postmenopausal osteoporosis; Rat; Osteoprotegerin; Raloxifene

妇女绝经后骨吸收相对大于骨形成, 导致骨量减少, 从而引起 PMOP。雌激素替代治疗能有效地预防和治疗 PMOP 症已得到理论和实践的证实^[1], 而且体内实验均表明雌激素的抗骨吸收效应是由 OPG 介导的^[2,3], RLX 作为选择性雌激素受体调节剂 (selective estrogen receptor modulator, SERM), 也可以

作者单位: 100095 北京, 北京友谊医院妇产科 (商敏) 北京大学第一医院妇产科 (杨欣、李亚珍、廖秦平) 北京世纪坛医院 (顾蓓); 北京首钢总医院 (吴琼)

通讯作者: 杨欣, Email: xinyang_2003@sina.com

有效的预防和治疗 PMOP,同时它对子宫和乳腺无刺激生长作用,规避了雌激素的部分风险,成为近年来治疗 PMOP 药物中研究的热点之一,本文以卵巢切除大鼠作为 PMOP 症模型,研究 RLX 对腰椎 OPG mRNA 表达的影响,进而探讨其是否与雌激素一样通过 OPG 发挥治疗 PMOP 的作用,从而为临床上 PMOP 症的诊治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象

6 月龄未交配健康雌性 SD 大鼠共 40 只,由中国科学院遗传与发育生物学研究所动物中心提供,体重 250 ~ 300 g。将大鼠随机分为 4 组(每组 10 只),A 组 :假手术(SHAM)组 ;B 组 :卵巢切除(OVX)组 ;C 组 :OVX 加 E₂ 0.8 mg/kg/d(协和药厂)组 ;D 组 :OVX 加 RLX 5 mg/kg/d(美国礼来公司)组。实验期间所有动物置于同一室内,二级环境分笼饲养,由北大医院动物室专人负责饲养,每日进食 20 g 左右,自由饮水,室温(21 ± 4℃),光照 12 h,黑暗 12 h。

1.2 方法

1.2.1 动物实验 大鼠适应性喂养 1 周后,以 5% 戊巴比妥钠 0.1 ml/kg 行腹腔内麻醉,完整切除双侧卵巢,即建立 OVX 去势动物模型,假手术组则在找到卵巢后即分层缝合,关闭伤口。术后 3 周起用以上药物灌胃 13 周后在 5% 戊巴比妥钠 0.1 mg/kg 麻醉下,仰卧位固定,剖取子宫,精密称量,并计算子宫重量系数(子宫重量/体重)。然后断头处死动物,第四腰椎剔除软组织后置于 75% 乙醇溶液中供组织计量学观察 ;第二腰椎剔除附件、椎间盘、脊髓及肌肉软组织,砸碎腰椎、生理盐水冲洗后迅速保存于液氮中,随后转移至 - 80℃ 冰箱保存,供骨标本 RNA 的提取。

1.2.2 骨组织形态计量指标测定

1.2.2.1 在中国人民解放军总医院骨科研究所病理室制作不脱钙骨切片 :处死大鼠后取四腰椎剔除软组织,立即放入 75% 乙醇,逐级脱水、浸透包埋、用碳化钨钢刀切片、用 95% 乙醇展片后移至载玻片,40 ~ 50℃ 烤箱过夜,次日取出保存。不脱钙普通切片用甲苯胺兰染色。

1.2.2.2 在上海第二医科大学第九人民医院骨科生物力学研究室进行图象分析 :将制作好的切片置于光学显微镜下观察,启动 FREEPLUS 软件将图象摄入数码相机储存,最后启动 FREEMAX 进行骨组织形态参数的测量。形态计量参数包括骨小梁体积

百分比(TBV%)和类骨质体积百分比(OSV%)。

1.2.3 骨标本 RT-PCR :取出 - 80℃ 冰箱中保存的第二腰椎,按 Trizol(美国 Introgen 公司)的说明书提取 mRNA,用紫外分光光度计测定 RNA 浓度。取 2 ~ 3 μg RNA,加 1 μg Random primer(美国 Promega 公司),加入无 RNA 酶水至 15 μl,70℃ 5 min 后立即放在冰上冷却 2 min,以使 RNA 的二级结构打开。再加 200 U M-MLV 逆转录酶(美国 Promega 公司),37℃ 60 min,94℃ 5 min,最后置于冰上完成 cDNA 第一链合成反应。根据核酸序列应用引物设计软件设计引物序列,委托上海申能博彩生物科技有限公司合成引物(见表 1)。

表 1 RT-PCR 引物序列

引物名称	扩增片段长度(bp)	引物序列	
OPG	430	LEFT PRIMER	5'-tcacttggcctcctgcta
		RIGHT PRIMER	5'-cgtctgggcgtgatcttctc
β-actin	290	Sense	5'-atctggcaccacaccttc
		Anti-sense	5'-agccaggtccagacgca

分别取不同标本的组织的单链 cDNA 为模板进行目的基因的扩增。采用 25 μl 反应体系,Taq 多聚酶 2.5 U(美国 Promega 公司),β-actin 和 OPG 的反应体系中 25 mM MgCl₂ 分别为 1.5 μl 和 2.0 μl。反应条件为 95℃ 预变性 5 min,变性 95℃ 30 S,退火 58℃ 30 S,延伸 72℃ 30 S ;于 PCR 仪内分别扩增 35 个循环,最后延伸 72℃ 7 min。取 PCR 产物 5 μl 与 1 μl 上样缓冲液混合后上样,2% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物,将琼脂糖胶放入 Alpha Imager™ 2200 图象分析处理系统,利用 Alpha Ease 40 软件,电脑直接扫描测定条带积分光密度值(350 nm),每份样本均以 β-actin 表达量为标准,比较每份样本中 OPG mRNA 的相对表达量(OPG/β-actin)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件对资料进行统计学分析。实验结果用均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)或中位数 M(最小值,最大值)进行描述。用单因素方差分析 ANOVA 及 LSD 检验对各指标的组间差别进行比较,不符合参数检验条件的指标改用多组秩和检验(Kruskal-Wallis 法),当 $P < 0.05$ 时认为组间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 经用药后,不同组大鼠子宫重量指数间存在差异,E₂ 组大鼠的子宫重量指数明显高于 OVX 组但低于 SHAM 组($P < 0.05$),RLX 组大鼠的子宫重量

指数明显低于 SHAM 组和 E₂ 组与 OVX 组接近(见表 2)。

2.2 对大鼠椎体的组织形态计量学研究发现,OVX 组大鼠与 SHAM 组相比骨小梁体积百分比(TBV%)明显下降($P < 0.05$),类骨质体积百分比(OSV%)明显增加,E₂ 和 RLX 组的骨小梁体积百分比(TBV%)较 OVX 组均明显增加,接近 SHAM 组,而类骨质体积百分比(OSV%)明显低于 OVX 组(见表 2)。

2.3 经 RT-PCR 实验,2.5% 琼脂糖凝胶电泳后,可见 430 bp 和 290 bp 的两条带,分别代表 OPG cDNA 和 β -actin cDNA 的扩增产物,与预期结果相符。430 bp 的条带经奥科公司测序证实为 OPG 基因。它们在各组大鼠腰椎组织中的表达情况见图 1 与表 2。OVX 组大鼠 OPG mRNA 表达水平显著低于 SHAM 组大鼠,E₂ 和 RLX 组大鼠的 OPG mRNA 水平显著高于 OVX 组($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠子宫重量指数、TBV%、OSV% 和 OPG

组别	n	子宫重量指数 (10 ⁻⁴ g/g)	TBV% (%)	OSV% (%)	OPG
SHAM 组	10	34(20,56)	34.33 $\pm$ 3.21	3.03 $\pm$ 0.74	0.33037(0.152,2.077)
OVX 组	10	5(3,9)	15.21 $\pm$ 3.38 *	8.47 $\pm$ 2.74 *	0.13450(0.079,0.163) *
E ₂ 组	10	14(8,23) * Δ	33.05 $\pm$ 2.68 Δ	3.89 $\pm$ 1.72 Δ	0.40020(0.130,0.818) Δ
RLX 组	10	5(3,10) *	29.74 $\pm$ 3.18 * Δ	2.92 $\pm$ 0.8 Δ	0.44385(0.151,1.003) Δ

注:与 SHAM 组比较,* $P < 0.05$,用药组与 OVX 组比较, Δ $P < 0.05$

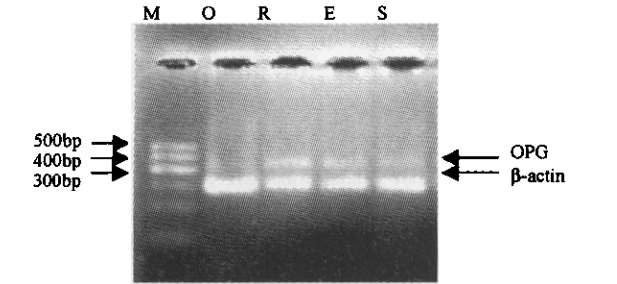


图 1 各组大鼠 OPG 表达情况(M 为 DNA marker;S 为 SHAM 组;O 为 OVX 组;E 为 E₂ 组;R 为 RLX 组)

3 讨论

骨质疏松症是骨强度削弱导致患者发生骨折风险增加为特征的一种骨骼疾病^[4]。严重影响绝经后妇女的健康,我国 60 岁以上老年妇女中 PMOP 症发生率为 28.6%^[5]。PMOP 的发生与雌激素缺乏密切相关。近年来研究发现,体内诸多激素和因子(包括雌激素)都是通过影响 OPG-RANKL-RANK 系统对骨代谢发挥作用的^[6]。OPG-RANKL-RANK 系统是近年来发现的在破骨细胞分化过程中的一个重要信号

传导通路,是骨骼生理研究领域的重大进展。包括护骨素(Osteoprotegerin,OPG)、细胞核因子- κ B 受体活化因子 RANK(receptor activator of NF κ B)和细胞核因子- κ B 受体活化因子配基 RANKL(Ligand of receptor activator of NF κ B)。成骨细胞及骨髓基质细胞表达 RANKL,与破骨细胞前体细胞或破骨细胞表面上的 RANK 结合后,促进破骨细胞的分化及骨吸收活性。成骨细胞及骨髓基质细胞分泌表达 OPG 与 RANKL 竞争性结合,阻止 RANKL 与 RANK 之间的结合,进而抑制破骨细胞的活化及骨吸收活性,导致破骨细胞凋亡来抑制骨吸收。也就是说,OPG-RANKL-RANK 系统是成骨细胞和骨髓基质细胞调控破骨细胞分化和活性的关键环节。

本实验中,OVX 组大鼠较 SHAM 组子宫重量指数显著下降($P < 0.05$),这是由于子宫是雌激素的靶器官,缺乏雌激素,子宫逐渐萎缩,提示手术成功造成了人工绝经。对大鼠椎体的组织形态计量学研究发现,OVX 组大鼠与 SHAM 组相比,类骨质体积百分比(OSV%)明显增加($P < 0.05$),说明大鼠卵巢切除后成骨细胞活性增强,骨重建活跃,骨形成加速,而反映骨小梁基本结构特点及其骨组织量的参数 TBV% 反而下降,表明骨转换加快,骨吸收大于骨形成,呈骨量丢失状态,提示大鼠切除卵巢后,骨转换(包括骨形成和骨吸收)加速,但骨吸收大于骨形成,最终导致骨丢失、骨量减少。这些特征与妇女 PMOP 的骨骼改变类似,表明本实验中制作的 6 月龄 SD 大鼠去卵巢 3 个月后的骨骼状况能较好地反映妇女 PMOP 的特征,提示手术成功造成了人工 PMOP 模型,可以用于对 PMOP 的研究。

RLX 是通过 ER 发挥治疗 PMOP 作用的,这一点目前已经达成共识^[7]。为研究 RLX 影响骨代谢的分子机制,Viereck 等^[8]研究发现 RLX 可使人成骨细胞(hOB)中 OPG mRNA 表达和蛋白分泌均增加,Chueng 等^[9]研究了 RLX 对原代 hOB 和具有 hOB 特征的人骨髓基质细胞的无限细胞系(HCC 1)RANKL 和 OPG 蛋白表达及 RANKL 和 OPG mRNA 的影响,结果发现,RLX 可使 RANKL/OPG 比值显著下降提示 RLX 的抗骨吸收作用至少部分是通过调节 RANKL/OPG 的调节实现的。但目前国内外均尚无关于 RLX 在体内对 OPG 表达的影响情况的研究结果发表,鉴于体内环境的复杂性,体外条件下所得出的结论并不一定能推广到体内,为证实多项体外实验中的结论在体内环境下是否依然成立,我们进行了该项研究,结果显示,RLX 与 E₂ 一样,可使 OVX 大鼠腰椎

OPG mRNA 水平明显升高 ($P < 0.05$)。从而在体内实验中发现,RLX 可以上调 OVX 大鼠腰椎 OPG 基因的表达,从而抑制破骨细胞分化和活性,使骨吸收降低,进一步阐明并证实了其抑制破骨细胞骨吸收的分子机制,提示 RLX 的抗骨吸收效应是通过 OPG 介导的。

但是,RLX 和雌激素调节 OPG 表达的分子途径可能并不相同。Saika 等^[2]用稳定转染的方式使 ST-2 细胞过度表达人类 ER α ,则 17 β -E₂ 上调 OPG 而过度表达 ER β 不但没有上调反而逆转了 17 β -E₂ 对 OPG 的诱导作用,提示 17 β -E₂ 是通过 ER α 上调 OPG 的。SERMs 在 ER β 存在时激活 AP-1 路径最有效,ER β 在人和大鼠发育中的松质骨骨细胞中的表达明显^[10],OVX 大鼠骨丢失主要发生在松质骨上,从而推测在骨骼中通过 ER β 激活 AP-1 路径可能是 RLX 能够预防 PMOP 的主要原因。因此,RLX 和雌激素可能分别是通过两种不同的 ER 亚型对 OPG 的表达发挥作用的。此外,Yang 等^[11]研究表明,RLX 对骨的作用是通过 ER 的 RLX 反应元件(RRE,raloxifene response element)上调 TGF β 3 的基因表达实现的,不需要 ER 的 DNA 结合区。可见,虽然 RLX 和雌激素都是通过上调 OPG 的表达发挥治疗 PMOP 的作用,但它们可能分别是通过两种不同的 ER 亚型、作用于不同的反应元件,以不同的方式传导信号以调节 OPG 基因转录的,具体分子机制还有待进一步研究。

总之,本实验提示,RLX 通过抑制 OVX 大鼠骨转换发挥治疗 PMOP 的作用;PMOP 的发生与 OPG 下调有关,RLX 和 E₂ 一样,通过上调 OPG 的表达治疗 PMOP,但还需要进一步的研究以阐明具体的分子通路。此外,RLX 组大鼠的子宫重量指数明显低于 SHAM 组和 E₂ 组,而与 OVX 组接近,提示其对子宫表现为抗雌激素样作用,体现出了它作为 SERM 的组织选择性作用,与文献报道是一致的^[12]。

【参 考 文 献】

- [1] Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd. Sex steroid and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev*, 2002, 23 :279-302.
- [2] Saika M, Inoue D, Kido S, et al. 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology*, 2001, 142 :2205-2212.
- [3] 王宝利,郭若霖,左爱军,等.破骨细胞分化因子和护骨素 mRNA 在 OVX 小鼠骨组织的相对表达. *中华老年医学杂志*, 2003,22 :608-611.
- [4] NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*, 2001, 285 :785-795.
- [5] 李宁华,区品中,朱汉民,等.中国部分地区中老年人骨骨质疏松症研究. *中国临床康复*, 2002, 6 :758-759.
- [6] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 2003, 423 :337-342.
- [7] Bryant HU, Glasebrook AL, Yang NN, et al. An estrogen receptor basis for raloxifene action in bone. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1999, 69 :37-44.
- [8] Viereck V, Grundker C, Blaschke S, et al. raloxifene concurrently stimulates osteoprotegerin and inhibits interleukin-6 production by human trabecular osteoblasts. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88 :4206-4213.
- [9] Cheung J, Mak YT, Papaioannou S, et al. Interleukin-6 (IL-6), IL-1, receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) and osteoprotegerin production by human osteoblastic cells: comparison of the effects of 17-beta oestradiol and raloxifene. *J Endocrinol*, 2003, 177 :423-433.
- [10] Bord S, Homer 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.
- [11] Yang NN, Bryant HU, Hardikar S, et al. Estrogen and raloxifene stimulate transforming growth factor-beta 3 gene expression in rat bone: a potential mechanism for estrogen-or raloxifene-mediated bone maintenance. *Endocrinology*, 1996, 137 :2075-2084.
- [12] Jolly EE, Bjamason NH, Neven P, et al. Prevention of osteoporosis and uterine effects in postmenopausal women taking raloxifene for 5 years. *Menopause*, 2003, 10 :337-344.

(收稿日期:2006-06-12)