

选择性雌激素受体调节剂-雷诺昔酚对去势后大鼠骨组织中 TNF- α 表达的影响

段永宏 杨卫红 刘建

摘要:目的 了解选择性雌激素受体调节剂(SERM)对去卵巢大鼠骨组织形态计量学指标、骨密度及松质骨中 TNF- α 表达的影响。方法 将 8 月龄未经产雌性二级 SD 大鼠 30 只,随机分为假手术(SHAM)组、去势(OVX)组、去势+雷诺昔酚(OVX+RAL)组。OVX+RAL 组大鼠术后第 2 天开始给予雷诺昔酚灌胃。术后 20 wk 处死各组大鼠,对各组大鼠不同部位骨组织形态计量学指标、骨密度(BMD)进行检测,并利用免疫组织化学染色及图像分析方法对各组大鼠松质骨切片 TNF- α 表达图像进行分析,观察 RAL 对 OVX 大鼠腰椎松质骨中 TNF- α 表达的影响。结果 (1)与 SHAM 组相比,OVX 组大鼠骨小梁体积、骨小梁平均厚度、皮质骨厚度等骨形态计量学指标明显下降($P < 0.01$),OVX+RAL 组大鼠骨形态计量学指标明显大于 OVX 组($P < 0.01$),接近 SHAM 组水平($P > 0.05$);(2)与 SHAM 组相比,OVX 组股骨近端、股骨干、腰椎 BMD 明显降低($P < 0.01$),RAL 治疗组各部位 BMD 高于 OVX 组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)接近 SHAM 组水平($P > 0.05$);(3)去势组与 SHAM 组相比较,TNF- α 表达的灰度值明显降低($P < 0.01$),RAL 组较 OVX 组灰度值明显升高($P < 0.01$),经 RAL 治疗后的去卵巢大鼠骨小梁周围及髓腔内 TNF- α 阳性表达明显减弱($P < 0.01$),接近 SHAM 组水平($P > 0.05$)

结论 RAL 可通过抑制破骨性因子 TNF- α 表达来抑制因雌激素缺乏引起的骨密度降低及骨形态结构退变。

关键词:骨质疏松;选择性雌激素受体调节剂;骨组织形态计量学;骨密度;肿瘤坏死因子- α

Influence of SERMs-raloxifene on bone morphometry ,bone mineral density and expression of TNF- α in cancellated bone in ovariectomized rats DUAN Yonghong , YANG Weihong , LIU Jian . Department of Orthopaedics , the 451st Hospital of PLA ,Xi'an 710054 ,China

Abstract : Objective To discuss the influence of selective estrogen receptor modulator(SERM) on Expression of TNF- α in cancellated bone and bone mineral density and the parameters of bone morphometry in ovariectomized rats. **Methods** Thirty female SD rats were divided into three groups(10 rats per group):sham operation group , ovariectomized group and therapeutic group. Bilateral ovariectomies were done on ovariectomized group and therapeutic group. Sham operation was done on sham operation group. Therapeutic group was treated with raloxifene 1 day after operation. Twenty weeks after operation ,all rats were sacrificed. The parameters of bone morphometry were measured by certain method. BMD of L₃-L₅ vertebrae ,proximal femoral segment ,femoral body by dual energy-x-ray absorptiometry(DEXA) ,SABC immunohistochemistry and Image Analysis was used to detect the expression of TNF- α in L₂ Vertebrae bone of every group. **Results** ①Twenty weeks after ovariectomy ,the index of bone morphometry decreased significantly($P < 0.01$) ,In therapeutic group ,every parameter of bone morphometry was maintained , close to the level of sham group($P > 0.05$). ②Twenty weeks after ovariectomy ,BMD of L₃-L₅ vertebrae ,proximal femoral segment ,femoral body of ovariectomized rats decreased significantly($P < 0.01$ or $P < 0.05$),the trabecular became thinner and irregular compared with sham group and therapeutic group. After treatment of raloxifene ,the above parameters was maintained , close to the level of sham group($P > 0.05$). ③The grayscale of TNF- α in cancellated bone in ovariectomized group was lower than that in sham group($P < 0.01$) and

lower than that in therapeutic groups ($P < 0.01$). **Conclusions** raloxifene could inhibit expression of TNF- α in cancellated bone of ovariectomized rats and inhibit occurrence of osteoporosis in ovariectomized rats.

Key words: osteoporosis; selective estrogen receptor modulator; bone morphometry; bone density; tumor necrosis factor- α (TNF- α)

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMO) 是一种严重危害人类健康的代谢性疾病, 其特点是骨转换加快, 成骨与破骨作用失去平衡, 骨量减少和骨组织显微结构受损, 继而引起骨骼脆性和骨折危险性增加。以往主要通过雌激素替代疗法来预防和防治 PMO。雌激素的骨保护作用主要是抑制破骨细胞的增殖和活性, 减缓和抑制骨吸收, 并促进成骨作用。但长期应用会增加乳腺癌和子宫内膜癌的危险性^[1, 2], 使得雌激素替代疗法防治 PMO 受到了限制。RAL 是选择性雌激素受体调节剂 (selective estrogen receptor modulator, SERM) 的新一代衍生物, 对骨组织具有雌激素样骨保护作用, 对乳腺和子宫则具有拮抗雌激素的作用, 在防治 PMO 的同时也避免雌激素替代疗法对机体产生的副作用。本次实验, 我们通过 RAL 对去势后大鼠骨组织形态计量学指标、骨密度和松质骨中 TNF- α 表达的影响来探讨 SERM 的骨保护作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

Sprague-Dawley 雌性大鼠 (第四军医大学实验动物中心提供); 雷诺昔酚片剂 (礼来苏州制药有限公司, 批号: A 070647); 兔抗大鼠 TNF- α 多克隆抗体、SABC 免疫组化试剂盒及 DAB 显色剂 (武汉博士德生物工程有限公司); DPX-IQ 型骨密度仪及中小动物软件系统 (Lunar 公司, 美国); LEICA DM LA 显微镜及 Leica Q-Win Stander V 2.3 全自动图像分析系统 (Leica 公司, 德国)。

1.2 方法

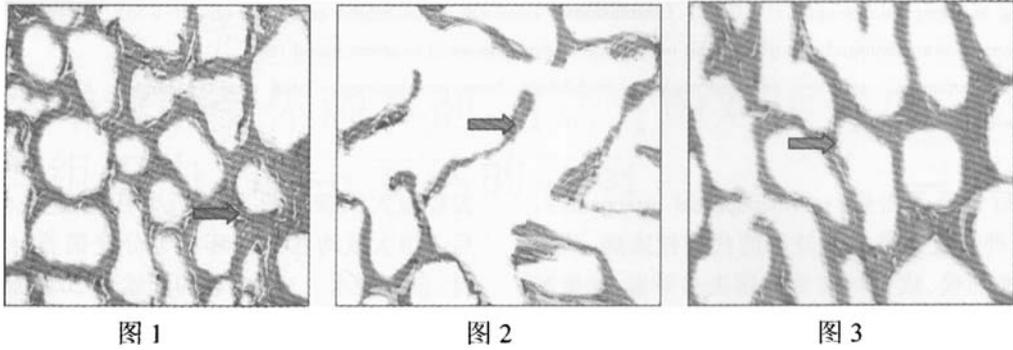
1.2.1 分组和处理: 8 月龄未产雌性二级 SD 大鼠 30 只, 体重 320 ± 25 g, 随机分为 3 组: SHAM 组、OVX 组、OVX + RAL 组, 每组 10 只, 组间大鼠体重无统计学意义。所有大鼠均以 3% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔内注射麻醉, 在无菌条件下手术, 取背部切口。分离、结扎、摘除 OVX 组、OVX + RAL 组大鼠双侧卵巢; 分离、提出 SHAM 组大鼠双侧卵巢后, 放回腹腔, 分层缝合关闭切口。术后第 2 天开始将雷诺昔酚片剂碾碎制成浓度为 0.3 g/L 的生理盐水悬液, 按每只 1 mg/(kg·d) 给 RAL 组大鼠灌胃。假手术组、

去势组大鼠按每只 3 ml/kg/d 用生理盐水灌胃。术后 3 组大鼠均在二级环境下分笼饲养, 给予标准饲料, 自由饮水。3 组大鼠均于术后 20 周后处死。

1.2.2 标本采集制备方法: 各组大鼠腹腔内注射麻醉, 取各组大鼠股骨、腰椎用于测量骨密度。取 L₂ 椎体及股骨髁部置于 4% 的多聚甲醛溶液 4 °C 环境下固定 48 h, 再放入 15% EDTA 溶液中脱钙 2 周, 每 3 天更换 1 次脱钙液, 脱钙完成后, 标本经梯度酒精逐级脱水后, 石蜡包埋、切片, 切片厚度 4 μ m; 股骨髁部及部分 L₂ 椎体切片进行 HE 染色, 并进行骨形态学计量分析, 部分 L₂ 椎体切片进行免疫组化染色。

1.2.3 免疫组织化学染色: 免疫组化染色过程 (1) 切片浸入二甲苯、梯度酒精脱蜡、脱水, 在室温 20 °C 下置于 3 ml/L H₂O₂ 溶液中灭活内源性过氧化酶, 蒸馏水清洗 3 次; (2) 切片浸入 0.01M 枸橼酸盐缓冲液, 用电炉加热至沸腾后熄火, 间隔 6 min 后再反复加热 2 次, 冷却后 PBS 清洗 2 次, 滴加 5 ml/L BSA 封闭液, 室温下孵育 20 min, 甩去多余的液体; (3) 滴加 1:300(400) 兔抗大鼠 TNF- α 多克隆抗体 (I 抗), 在室温下孵育 2 h 后用 0.01 mmol/L PBS 清洗 3 min \times 3 次; (4) 滴加 1:300(400) 生物素化山羊抗兔 IgG (II 抗), 室温下孵育 20 min, 0.01 mmol/L PBS 溶液冲洗 2 min \times 3 次; (5) 滴加 SABC 试剂, 室温下 20 min, 0.01 mmol/L PBS 清洗 5 min \times 3 次; (6) DAB 显色, 显微镜下观察有棕黄色物质出现时停止; (7) 蒸馏水冲洗, 苏木素复染细胞核, 常规梯度酒精脱水、二甲苯透明, 中性树脂胶封片。

1.2.4 骨组织形态计量学分析: 采用德国 Leica Q-Win Stander V2.3 全自动图像分析系统, 采集大鼠 L₂ 椎体骨组织切片图像 (每只 3 张), 并对图像进行影像学处理 (附图 1~3); 通过计算机自动分析系统测量已处理图像骨小梁基础参数: 骨小梁面积 (Tb.Ar), 骨小梁周长 (Tb.Pm), 皮质骨面积 (Ct.Ar), 皮质骨周长 (将皮质骨截面近似的认为是矩形, 以皮质骨外膜周长 P.Pm 代表皮质骨周长); 利用骨组织计量学公式计算其他骨组织学参数: ① 骨小梁体积百分比: BV/TV (%) 即: 骨小梁面积 (髓腔面积 + 骨小梁面积) \times %; ② 骨小梁平均厚度 (Tb.Th) (Tb.Ar/



附圖 1~3 图像处理后 SHAM 组、OVX 组、RAL 组松质骨骨小梁结构(×100)

Tb. Pm (μm) ;③皮质骨平均厚度(CT)(μm) (Ct. Ar/ P. Pm (μm))

1.2.5 骨密度测量 使用 DPX-IQ 型 7040 双能 X 线吸收测量平台,通过计算机中小动物软件系统测股骨粗隆部、股骨干中点及第 3~5 腰椎中点 BMD。

1.2.6 图像分析 骨组织形态学及骨免疫组织化学观察采用 LEICA DM LA 显微镜及 Leica Q-Win Stander V2.3 全自动图像分析系统。组织形态学观察 光镜下观察 L₂ 椎体 HE 染色切片形态学特征。采用计算机图像分析系统测定免疫组化染色片中 TNF-α 表达的平均灰度值。判定方法:灰度值越小,阳性染色越强,表明免疫反应性越高。结果进行统计学处理。

1.2.7 统计学方法:采取 SPSS 11.5 软件进行统计分析,所有参数均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采用方差分析, LSD-t 检验。

2 结果

2.1 显微镜下观察

椎体松质骨中 TNF-α 主要分布在骨小梁周围的成骨细胞、骨基质中;胞核及胞质中均有阳性染色;与 SHAM 组比较,OVX 组大鼠松质骨中 TNF-α 阳性反应明显增强,而 RAL 治疗组 TNF-α 阳性表达明显减弱。图 4~6 分别为对照组、去势组、治疗组腰椎松质骨 TNF-α 免疫组织化学染色(抗体稀释度为 1:400,箭头所指为阳性染色 SABC × 400)。

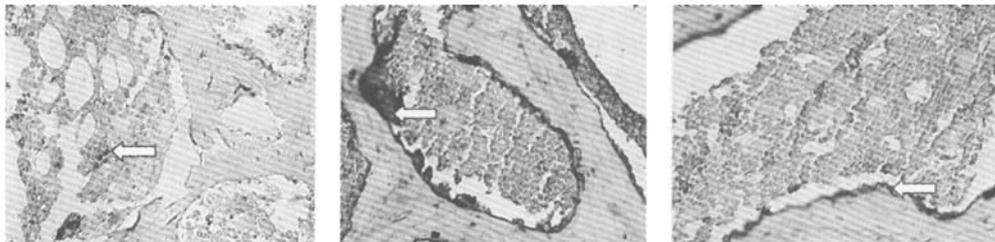


图 4

图 5

图 6

2.2 图像分析

去势组与 SHAM 组相比较,TNF-α 阳性细胞灰度值明显降低($P < 0.01$),而 RAL 治疗组 TNF-α 阳性细胞灰度值高于 OVX 组($P < 0.01$) (见表 1)。

表 1 各组松质骨中 TNF-α 阳性细胞灰度值对比($\bar{x} \pm s$)

组别	SHAM	OVX	OVX + RAL
灰度值	181.95 ± 22.63*	145.36 ± 25.06	160.45 ± 19.25 [△]

注:与 OVX 组比较,* $P < 0.01$;与 SHAM 组比较,[△] $P < 0.01$

2.3 术后 20 周 OVX 组与 SHAM 组比较,皮质骨及松质骨 BMD 均明显降低。股骨近端粗隆部、股骨干、第 3~5 腰椎 BMD 均明显下降($P < 0.01$);OVX + RAL 组与 OVX 组比较,股骨近端粗隆部、第 4、5

腰椎 BMD 明显高于 OVX 组($P < 0.01$) 股骨干、第 3 腰椎 BMD 均高于 OVX 组($P < 0.05$),OVX + RAL 组与 SHAM 组比较,股骨近端、股骨干、第 3~5 腰椎 BMD 接近 SHAM 组($P > 0.05$) (见表 2)。

表 2 各组 BMD 测定值比较($\bar{x} \pm s$, g/cm²)

部位	SHAM	OVX	OVX + RAL
股骨近端	0.190 ± 0.024**	0.159 ± 0.020	0.188 ± 0.022 ^{△△}
股骨干	0.171 ± 0.012**	0.152 ± 0.011	0.167 ± 0.010 ^{△△}
L ₃	0.192 ± 0.015**	0.165 ± 0.013	0.179 ± 0.016 ^{△△}
L ₄	0.207 ± 0.011**	0.183 ± 0.013	0.197 ± 0.010 ^{△△△}
L ₅	0.221 ± 0.012*	0.189 ± 0.012	0.211 ± 0.011 ^{△△△}

注:与 OVX 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 SHAM 组比较,[△] $P > 0.05$

2.4 骨组织形态计量学分析

与 SHAM 组比较,OVX 组骨小梁体积、骨小梁平均厚度、皮质骨厚度显著下降 ($P < 0.01$);RAL 治疗组的上述参数明显高于 OVX 组 ($P < 0.01$),与 SHAM 组差异无显著性 ($P > 0.05$) (见表 3、图 7)。

表 3 各组大鼠腰椎骨组织形态计量学参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

参数	SHAM	OVX	OVX + RAL
BV/TV (%)	44.12 ± 3.59	27.69 ± 3.9*	41.43 ± 3.6 [△]
Tb. Th (μm)	32.84 ± 5.65	21.33 ± 4.01*	29.70 ± 5.46 [△]
CT (μm)	52.36 ± 4.74	38.40 ± 4.08*	49.36 ± 3.19 [△]

注:与 SHAM 组及 OVX + RAL 组比较,* $P < 0.01$;与 SHAM 组比较,[△] $P > 0.05$

2.5 骨组织形态学观察

腰椎及股骨髁部 HE 切片光镜下观察见:OVX 组骨小梁明显稀疏,皮质骨变薄,小梁及间隙增大,部分区域骨小梁消失;治疗组与 OVX 组对比,小梁相对丰富,骨皮质较厚,小梁间隔较小,接近假手术组。图 8~10 分别为对照组、去势组、治疗组腰椎骨小梁结构的组织学对比;图 11~13 分别为对照组、去势组、治疗组股骨髁部骨小梁结构的组织学对比 ($\times 100$,箭头所指为骨小梁)。

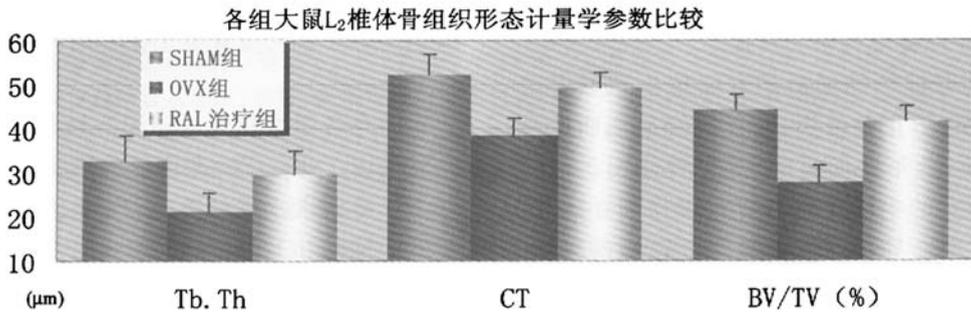
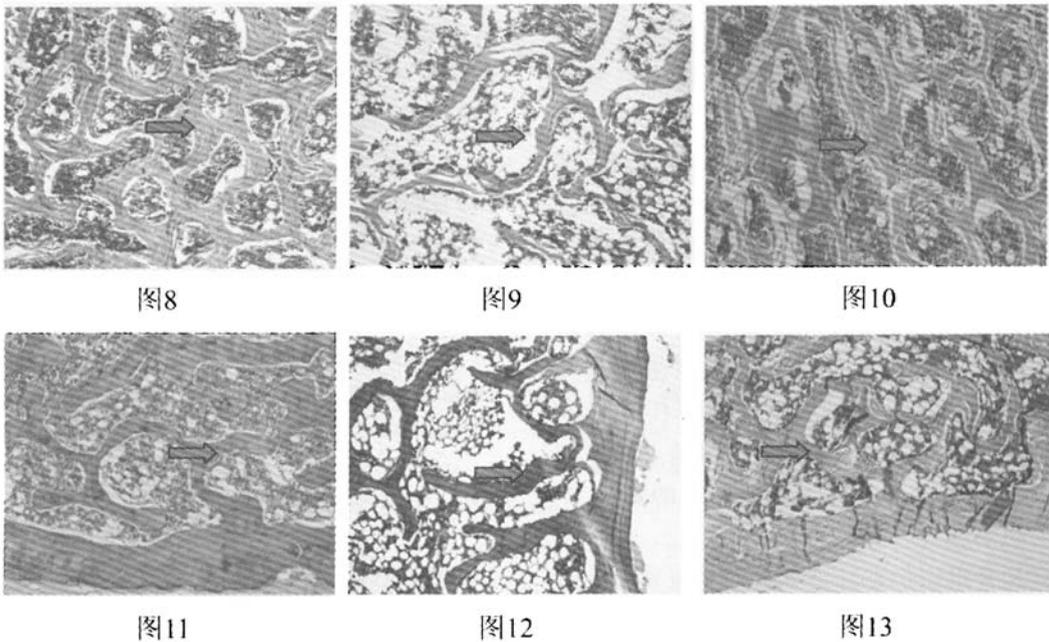


图 7 各组大鼠 L₂ 椎体骨组织形态计量学参数比较(与 SHAM 组、OVX + RAL 组比较,* $P < 0.01$,与 SHAM 组比较,[△] $P > 0.05$,n = 10)



3 讨论

TNF α (肿瘤坏死因子 α) 是一种强有力的骨吸收诱导剂,主要由单核巨噬细胞产生;TNF α 具有抑制骨形成、促进骨吸收的作用;其骨吸收作用主要是通过增加破骨细胞数量、减少骨基质钙化、抑制成骨细

胞活性来完成的。研究表明,TNF α 可直接促进破骨细胞前体细胞的有丝分裂及破骨祖细胞的分化^[3],并对成熟破骨细胞的骨吸收功能产生促进作用^[4],还间接通过介导基质细胞和成骨细胞表达参与破骨细胞分化所必需的“下游”细胞因子如:巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因

子(GM-CSF)、白介素-6(IL-6)、白介素-11(IL-11)等促进破骨祖细胞的增殖,增强破骨细胞活性^[5]。TNF- α 对骨代谢的作用受雌激素的调节,雌激素通过抑制AP-1依赖的转录,调节c-Jun表达以及抑制c-Jun末端激酶磷酸化来抑制和下调TNF- α 基因的表达,达到抑制骨吸收的作用^[6]。正常的骨组织代谢是由破骨细胞不断吸收旧骨,成骨细胞沉积新骨以维护骨正常的质和量,使骨转换始终处于一个动态平衡中。由于去卵巢后大鼠雌激素水平降低,雌激素对骨吸收的抑制作用减弱,增强的破骨作用刺激成骨反应使得骨转换加快,并且骨吸收始终大于骨形成,最终导致骨质疏松的发生^[7]。

雌激素具有抑制绝经后妇女泌尿生殖器官萎缩、抑制骨转换、防止骨丢失、改善绝经后血脂紊乱及记忆力下降(老年性痴呆症)等多种作用^[8-10],对改善绝经后妇女的生活质量具有积极作用。然而,雌激素长期应用会导致子宫内膜和乳腺增殖,增加患子宫内膜癌和乳腺癌的危险性。

SERM是一类化学结构类似雌二醇人工合成非甾体化合物,含有多种衍生物,通过与雌激素竞争结合雌激素受体(ER)发挥作用,对女性生殖系统具有拮抗雌激素的作用,而对骨骼及心血管系统则起保护作用。RAL是SERM新一代的衍生物,有良好的组织选择性,对下丘脑、乳腺和子宫内膜无刺激作用^[11-14],通过选择性结合位于成骨细胞、破骨细胞及骨细胞前体上的ER,由ER介导,刺激成骨细胞,抑制破骨细胞,调控骨的形成、吸收和骨改建。研究表明^[15]ER与雌激素类物质结合后,激活多个位于DNA上的应答素(DNA response element),如雌激素应答素及RAL应答素,通过应答素来调节基因转录,影响蛋白合成,如Osteonectin基因、尿激酶胞质素原激活基因、特异性神经轴突生长蛋白GAP-43基因及癌蛋白C-MYC基因等,这些基因通过调节编码在骨、心血管和神经系统中起重要作用的蛋白,产生不同的生物效应。

骨密度和骨组织形态计量学参数是反映骨生长代谢情况的重要指标,能直接反映骨质量和性能。去势20周后,OVX组腰椎、股骨干、股骨近端BMD、骨小梁体积、骨小梁平均厚度、皮质骨厚度等骨形态计量学指标较SHAM组明显下降($P < 0.01$),表明去势后大鼠皮质骨、松质骨骨量均明显丢失,骨形态计量学指标数值发生了明显改变,骨显微结构受到破坏,发生骨折的危险性增加。经RAL治疗20w后的去势大鼠,各部位骨密度无明显减少,松质骨、皮

质骨BMD大于单纯去势组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),各骨形态计量学指标数值明显大于OVX组($P < 0.01$),接近SHAM组水平($P > 0.05$),说明RAL能够明显延缓和抑制去势大鼠BMD和骨矿含量的降低,对维持低雌激素水平情况下骨细微结构有显著疗效。

去势20wk后大鼠松质骨中TNF- α 阳性细胞灰度值较SHAM组明显降低($P < 0.01$),说明去势大鼠松质骨中TNF- α 阳性反应较SHAM组明显增强;RAL治疗组的去势大鼠松质骨中TNF- α 阳性细胞灰度值明显高于OVX组($P < 0.01$),说明经RAL治疗后的去势大鼠松质骨中TNF- α 阳性表达受到了明显抑制。

结合各组大鼠骨组织形态计量学参数、BMD及松质骨中TNF- α 阳性灰度值的改变,进一步说明:去势大鼠雌激素水平的降低,使雌激素对TNF- α 基因表达的抑制和下调作用减弱,促进了骨吸收的作用,加快了骨质疏松的发生及骨微细结构的破坏,而RAL起到了类似雌激素的骨保护作用,抑制了去势大鼠松质骨中TNF- α 的表达,减弱了由TNF- α 诱导而产生的骨吸收,抑制了因雌激素缺乏引起的骨密度降低及骨形态结构退变。本实验说明:RAL通过抑制破骨性因子TNF- α 表达来抑制因雌激素缺乏引起的骨密度降低及骨形态结构退变,可能是SERM抑制绝经后妇女骨吸收及骨质疏松形成的重要机制之一,也说明RAL是目前防治绝经后妇女骨质疏松较为理想的类雌激素药物。

【参 考 文 献】

- [1] 陆叶,于丽,陈春玲,等.雌、孕激素和米非司酮对子宫内膜癌细胞的作用.北京大学学报(医学版),2005,33:37.
- [2] Schairer C, Lubin J, Troisi R, et al. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. JAMA, 2000, 283(4):485-491.
- [3] Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoblast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. J Exped Med, 2000, 191:275.
- [4] Burgess TL, Qhn Y, Kaufman S, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. J Cell Biol, 1999, 145:527.
- [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.
- [6] 何勇. IL-6、TNF- α 与绝经后骨质疏松. 国外医学内分泌学分册, 2003, 23(2):130-132.

(上接第 188 页)

- [7] 张胜利 ,王全平 . 雌激素在 I 型原发性骨质疏松症发病机制中作用的研究进展 . 中国骨质疏松杂志 ,1999 ,5(1) :86-87.
- [8] 妇女性激素补免疫法及其存在的问题 . 中国实用妇科与产科杂志 ,2000 ,16 :528-529.
- [9] 刘忠厚 . 主编 . 骨矿与临床 . 北京 :中国科学技术出版社 ,2006 . 489-500.
- [10] Evangelos R. The role of gp130-mediated signals in osteoclast development : regulation of interleukin-II production by osteoblasts and distribution of its receptor in bone marrow culture . J Exp Med , 1996 , 123 :2581.
- [11] 王瑞芹 ,陈晓 ,李灵芝 ,等 . 雷洛昔芬对非骨组织的影响 . 西北药学杂志 ,2002 ,17(4) :184-186.

- [12] Wang RQ ,Chen X ,Li LZH ,et al . The effect of raloxifene on un-bone tissue . Journal of north-west pharmaceutical sciences ,2002 ,37(4) : 184-186.
- [13] Baker VL ,Draper M ,Paul S ,et al . Reproductive endocrine and endometrial effects of raloxifeme hydrochloride ,a selective estrogen receptor modulator , in women with regular menstrual cycles . ClinEndocrinol Metab ,1998 ,83(1) 6-13.
- [14] Ceresini G ,Morganti S ,Rebecchi I ,et al . A one-year follow-up on the effects of raloxifene on thyroid function in postmenopausal women . Menopause 2004 ,11(2) :176-179.
- [15] 武晓蓉 ,李青南 . 骨组织雌激素受体及其应用的研究进展 . 中国骨质疏松杂志 ,2003 ,9(2) :182-184.

(收稿日期 :2006-12-30)