

地塞米松对不同月龄雌性大鼠成骨细胞雌激素受体表达的影响

聂雷生 陶树清 张国峰 刘慧雯 陶天遵

摘要: **目的** 观察体外培养的不同月龄雌性大鼠成骨细胞内雌激素受体水平的差异及地塞米松(1×10^{-8} mol/L)对不同月龄雌性大鼠成骨细胞雌激素受体表达的影响。**方法** 采用酶消化法分别提取、纯化和培养新生(24 h 以内)、2、4、8、12 月龄雌性 Wistar 大鼠成骨细胞,并且用 Western-blot、ECL 法检测体外培养成骨细胞雌激素受体的水平。**结果** 提取的大鼠成骨细胞生长情况良好,碱性磷酸酶染色阳性,具有成骨细胞特性。Western-blot 结果显示:雌性大鼠成骨细胞内雌激素受体水平在新生鼠和 8 月龄鼠较高,在 2、4、12 月龄鼠较低;地塞米松组成骨细胞雌激素受体表达水平在新生和 2 月龄低于对照组,在 4、8、12 月龄高于对照组。**结论** 不同月龄雌性大鼠体外培养的成骨细胞雌激素受体的表达水平不同; 1×10^{-8} mol/L 地塞米松对体外培养的雌性大鼠成骨细胞雌激素受体水平有影响且与大鼠的月龄有关。

关键词: 成骨细胞; 地塞米松; 雌激素受体; 大鼠

Effects of dexamethasone on the expression of estrogen receptor in osteoblast of different months old female rat NIE Leisheng, TAO Shuqing, ZHANG Guofeng, et al. Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Abstract: **Objective** To study the effects of dexamethasone on the expression of estrogen receptor in osteoblast of different months old female rats. **Methods** A large amount of osteoblasts were isolated and cultured from the trabecular bone of different months old female Wister rats with trypsin and collagenase II digestion method. Osteoblast was confirmed by the morphology alkaline phosphatase staining and estrogen receptor was detected by immunohistochemistry and western-blot. **Results** The osteoblasts isolated by the method above mentioned showed positive by the methods of morphology alkaline phosphatase staining and immunohistochemistry. The result of western-blot showed that the ER in osteoblast of female rat expression was higher on the newborn and 8-month-old rats than on the 2-, 4- and 12-month-old ones. The level of ER expression in the osteoblasts which was affected by the dexamethasone was higher on the 4-, 8- and 12-month-old female rats and lower on the newborn and 2-month-old ones, compared with the ER level of the osteoblasts without the effect of dexamethasone. **Conclusions** The level of ER expression in the osteoblast of female rat is different in rats of different age. ER expression's up-regulation or down-regulation in osteoblast of rat by dexamethasone at the concentration of 1×10^{-8} mol/L is correlated with the age of rats.

Key words: Osteoblast; Dexamethasone; Estrogen receptor; Rat

雌激素受体对骨代谢以及绝经后骨质疏松的重要性已被公认,成骨细胞表达雌激素受体,雌激素受体对成骨细胞有着重要的作用^[1]。地塞米松是甾体

糖皮质激素衍生物,与雌激素同属甾体激素超家族,而且大量研究表明,地塞米松对成骨细胞的作用有剂量-时间依赖性^[2]。那么,地塞米松对成骨细胞的影响是否有雌激素受体的参与。如果有,地塞米松又是怎样通过雌激素受体发挥作用的呢?这种作用是否是通过改变雌激素受体的表达水平而影响成骨细胞的呢?本研究旨在探求并试图回答这些问题。

基金项目:黑龙江省“十五”攻关项目(G00C190702)

作者单位:150086 哈尔滨,哈尔滨医科大学附属第二医院骨外科(聂雷生、陶树清、张国峰、陶天遵);哈尔滨医科大学基础医学院组胚教研室(刘慧雯)

通讯作者:陶树清,Email: taoshuqing@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 实验动物

新生、2、4、8、12 月龄健康 Wistar 雌性大鼠各 6 只(哈尔滨医科大学动物实验中心提供)。

1.2 主要试剂

雌激素受体检测试剂盒(武汉博士德), Western-blot-ECL 荧光显色试剂盒(上海申能博采), 碱性磷酸酶染色试剂盒(上海中控), 胰蛋白酶、Ⅱ型胶原酶(Sigma), 胎牛血清(天津 T.B.D.), DMEM 高糖培养液(Hyclone)地塞米松(Sigma), SDS, 二硫苏糖醇 DTT, 丙稀酰胺, 双甲叉丙稀酰胺, PMSF(Sigma)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及给药方法:取大鼠颅骨及四肢长骨提取和纯化成骨细胞, 并传代培养。取 2 代成骨细胞分组: A 组正常培养对照组; B 组添加 1×10^{-8} mol/L 地塞米松培养干预组, 继续培养 1 周后用于实验研究。

1.3.2 大鼠成骨细胞体外分离、纯化和培养:大鼠引颈处死后投入盛有 75% 酒精的烧杯消毒 3 ~ 5 min, 无菌 PBS 液冲洗。超净工作台内无菌取颅骨及四肢长骨, 刮匙搔刮骨面至毛糙, PBS 液冲洗, 并将骨组织剪成 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 大小骨粒。0.25% 胰蛋白酶 10 mL, 37 °C 震荡消化 15 min, 弃上清。10 倍体积的 0.1% Ⅱ型胶原酶, 37 °C 恒温震荡(60 ~ 90 次/min)消化 10 min, 弃上清, 然后多次用 10 倍体积的 0.1% Ⅱ型胶原酶, 37 °C 恒温震荡消化剩余骨组织, 收集消化液及冲洗液经 200 目不锈钢筛网过滤后 1000 rpm, 5 min 离心收集细胞。细胞用 5 mL 含 15% 胎牛血清 DMEM 培养基悬浮后反复贴壁纯化成骨细胞后细胞计数, 调整细胞密度约 4×10^4 /mL 接种于含 DMEM 培养液(内含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg /mL)的 35 mL 培养瓶中, 5% CO_2 , 37 °C 饱和湿度条件下恒温箱培养, 以后每 2 ~ 3 d 换液 1 次。前 1 周半量换液, 以后全量换。待细胞融合成单层后, 用 0.25% 胰酶消化并以 1:2 或 1:3 的比例进行传代。

1.3.3 大鼠成骨细胞的特征性鉴定:一般形态学观察:在传代消化和增殖过程中每天用相差显微镜观察。碱性磷酸酶染色:采用碱性磷酸酶(ALP)染色试剂盒染成骨细胞爬片。成骨细胞传代时取 6 孔培养皿, 皿底放盖玻片(多聚赖氨酸处理, 紫外线消毒), 每孔加入 1 mL 细胞悬液, 经 1 w 培养细胞爬满盖玻片。取出盖玻片立即放入 4% 丙酮酸固定 20

min, 然后滴几滴碱性磷酸酶染色液(满布盖玻片), 37 °C 温箱孵育 20 min, 清洗, 封固。显微镜观察分析。

1.3.4 成骨细胞雌激素受体免疫组化检测:细胞爬片经 4% 丙酮固定, 室温封闭 20 min 后, 加入 1:300 稀释的雌激素受体抗体, 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 加入 1:500 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗, 37 °C 孵育 40 min, PBS 洗涤 3 次。DAB 显色后苏木素复染, 封片。显微镜下观察结果。

1.3.5 成骨细胞雌激素受体蛋白质的半定量检测:成骨细胞培养满足实验条件后, 分别裂解上述 A、B 组细胞提取细胞总蛋白并调整浓度(10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。蛋白经变性, SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜(PVDF 膜)。PVDF 膜经封闭, 先后加 1:300 一抗(4 °C 过夜)和 1:500 二抗, 最后 ECL 法在暗室用 X 线底片曝光, 显影定影后用凝胶成像系统分析。

2 结果

2.1 成骨细胞的形态学观察

原代培养的成骨细胞贴壁前成均一的球形, 细胞周围可见高折光圈, 约 8 h 已贴壁, 不牢固。24 h 后已完全贴壁, 并有少量细胞伸出伪足(图 1)。至 48 ~ 72 h 完全贴壁伸展, 单核多角形, 形态不规则。随着培养时间的延长, 细胞伸出较多突起, 有的突起相互连接。约 2 ~ 3 w(原代)细胞生长融合成片, 满布培养瓶底, 细胞多呈多角形, 胞浆丰富, 类似“铺路石”样排列(图 2)。成骨细胞的提取和培养随着大鼠月龄的增加, 难度加大, 细胞不易成活, 贴壁晚, 生长缓慢。

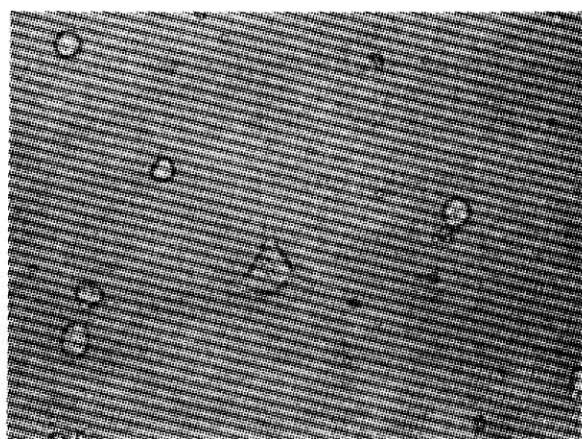


图 1 倒置显微镜下 24 h 成骨细胞 $\times 300$

2.2 成骨细胞碱性磷酸酶染色

ALP 阳性细胞可见被染成紫红色, 可见蓝紫色颗粒(图 3)。

2.3 大鼠成骨细胞雌激素受体免疫组化法分析

可见培养的成骨细胞表达雌激素受体, 细胞核

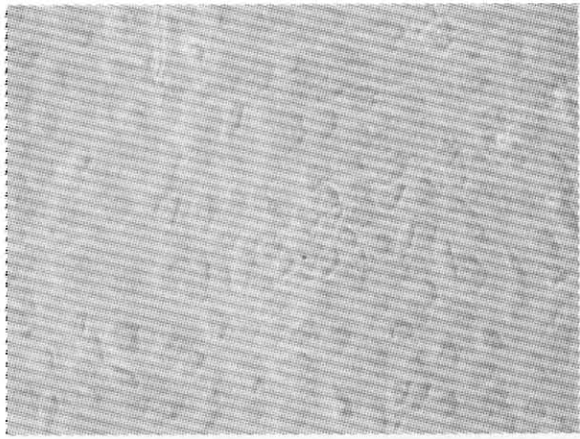


图 2 倒置显微镜下 2~3 周成骨细胞 × 300

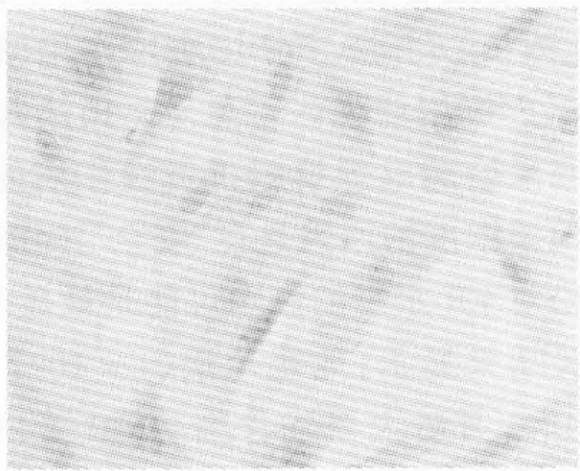
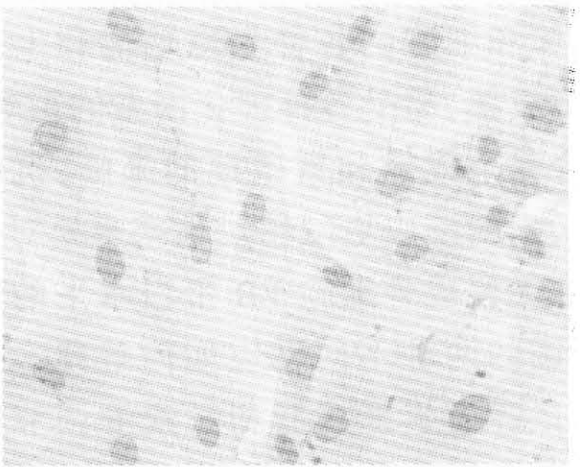
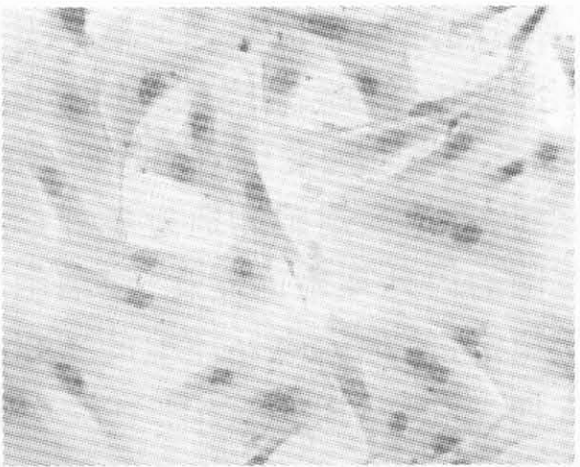


图 3 成骨细胞碱性磷酸酶染色 × 300

及胞浆被染成棕褐色(图 4)。



A 阴性对照



B 阳性图片

图 4 成骨细胞雌激素受体免疫组化 × 300

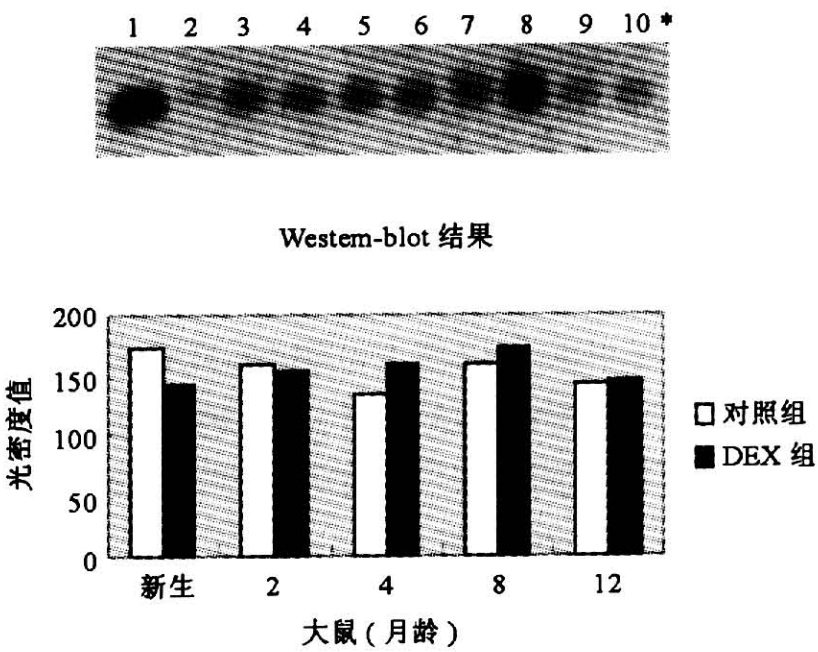
2.4 雌激素受体表达的检测

各月龄雌性大鼠成骨细胞 ER 的表达:新生大鼠(24 h 以内)成骨细胞 ER 高表达形成高峰。2 月

龄 ER 水平较新生下降,4 月龄 ER 水平较 2 月龄上升。至 8 月龄 ER 水平较 4 月龄升高,12 月龄 ER 水平下降。这种变化趋势与大鼠体内雌激素水平相适应(图 5)。

2.5 地塞米松对不同月龄雌性大鼠 ER 表达的影响

总体来看,地塞米松组成骨细胞雌激素受体表达水平在新生和 2 月龄低于对照组,在 4、8、12 月龄高于对照组(图 5)。



注: 1. 新生对照组;2. 新生 DEX 组;3. 2 月龄对照组;4. 2 月龄 DEX 组;5. 4 月龄对照组;6. 4 月龄 DEX 组;7. 8 月龄对照组;8. 8 月龄 DEX 组;9. 12 月龄对照组;10. 12 月龄 DEX 组

图 5 成骨细胞雌激素受体 Western-blot 结果

3 讨论

1988 年 Eriksen 等^[3]在体外培养的成骨细胞系中采用放射配基分析等方法检测出具有高亲合力的雌激素受体(ER)后,雌激素参与调节骨代谢的机制得到确认。大量研究表明:雌激素与骨细胞内 ER 结合后,调节特异 DNA 的转录水平,增加(或减少)相应的酶及细胞因子的生成(如 IGF, EGF, TGF- β , IL-1, IL-6, TNF- β , OPG 等)^[4],而这些酶及细胞因子是相互作用的调节网络系统,它们中的任何改变都会引起整个调节网络的改变,产生骨吸收或骨形成的增加、减少,甚至引起骨细胞的凋亡等一系列生理病理过程。

目前,许多体内体外实验证实雌激素和 ER 结合后能促进成骨细胞的增殖分化,增加骨的形成;抑制破骨细胞(甚至引起破骨细胞凋亡),减少骨的吸收。当雌激素缺乏时,骨量吸收增加,成骨作用减

弱,所以雌激素缺乏是绝经后骨质疏松的基本原因^[5]。雌激素是通过与 ER 结合发挥作用的,所以 ER 在骨中的表达水平的研究对研究骨的代谢以及骨内细胞因子的相互作用有重要价值。

地塞米松(DEX)是具有强而持久糖皮质激素作用的甾体衍生物,所以很多学者用地塞米松作为糖皮质激素的代表药物,观察试验对象对糖皮质激素的反应。有报道称,糖皮质激素对成骨细胞与破骨细胞的作用存在着剂量和激素种类依赖性,不同的剂量及不同种类的糖皮质激素对成骨细胞(破骨细胞)甚至产生完全相反的效果^[6]。低浓度地塞米松(1×10^{-8} mol/L)通过提高骨髓基质细胞中成骨细胞前体的聚集和成熟,有力的刺激了成骨细胞的分化和增殖^[7],而高浓度(1×10^{-6} mol/L)地塞米松可以增加间充质干细胞向脂肪细胞分化,减少向成骨细胞的分化^[8];并且可以使 Wnt 途径、MAPK 途径的抑制增强^[6],抑制成骨细胞代谢,甚至诱导成骨细胞凋亡^[6,9],并且随时间延长,作用更明显。还有报道称:地塞米松可降低护骨素(OPG),提高破骨细胞分化因子(RANKL,OPGL)的分泌,从而活化破骨细胞,增加骨的吸收^[10]。总之,药理剂量的地塞米松抑制成骨作用,增加骨吸收。长期的糖皮质激素治疗导致骨量丢失,增加骨折发生率,是继发性骨质疏松的常见原因。

糖皮质激素与雌激素对骨代谢都有重要作用,本实验通过对雌性大鼠成骨细胞的研究初步探讨糖皮质激素与 ER 的关系,同时也观察不同月龄雌性大鼠 ER 的表达规律。

新生雌性大鼠成骨细胞内 ER 短暂高表达,原因考虑为母体高雌激素水平,导致新生大鼠(24 h 以内)体内出现短暂高雌激素水平,可能使 ER 高表达。并且该 ER 水平与本实验检测的孕龄大鼠成骨细胞的 ER 水平相一致。此结果与 Nilsson 报道的 1~10 周龄大鼠成骨细胞 ER 低水平不一致。其原因可能是大鼠月龄不同,本实验选用的是新生 24 h 以内的大鼠。另外实验结果与大鼠种类,细胞提取方法,细胞传代次数、培养条件不同也有关系^[11]。该 ER 高峰随着新生大鼠体内雌激素水平下降而下降,即出现 2 月龄大鼠 ER 水平降低。从 4 月龄开始,雌性大鼠开始发育,体内雌激素水平逐渐升高,本实验检测的 ER 蛋白水平也逐渐升高。至 8 月龄时达到高峰。12 月龄大鼠开始衰老,体内雌激素水平下降,本实验检测到 12 月龄 ER 水平降低。由此看来,雌性大鼠成骨细胞 ER 表达水平的高低很可能

与体内雌激素水平的高低相适应。

本实验试图发现地塞米松对体外培养的成骨细胞的影响是否与影响 ER 蛋白水平有关。目前普遍认为:小剂量地塞米松能诱导间充质干细胞向成骨细胞分化增殖,增加细胞碱性磷酸酶水平;随着地塞米松剂量的增加,上述诱导作用减弱,反而诱导成骨细胞凋亡。可见地塞米松对成骨细胞同时存在上述两种完全相反的作用。至于哪种作用占主导地位则是地塞米松剂量依赖的。目前认为: 1×10^{-8} mol/L 的地塞米松对成骨细胞的诱导分化增殖作用最强^[12],在此浓度以上诱导分化增殖作用减弱,诱导成骨细胞凋亡作用增强。可见 1×10^{-8} mol/L 这个浓度是地塞米松对成骨细胞正负性作用的转折点。本实验选用该浓度的原因是在“安全”浓度下观察到的地塞米松对 ER 水平的影响可能是最显著的。

本实验结果显示:地塞米松(1×10^{-8} mol/L)可以下调新生、2 月龄大鼠成骨细胞 ER 蛋白水平;上调 4、8、12 月龄大鼠成骨细胞 ER 蛋白水平。其中地塞米松对新生、8 月龄大鼠 ER 蛋白水平影响显著,而这两个月龄可能是大鼠生长发育过程中的重要时期:一是刚脱离母体,独自完成摄取营养和新陈代谢的开始,机体和细胞的各种生理功能和生理生化调节机制很不成熟,易受各种理化因素的影响;另一个是生长发育完全成熟和繁殖期的来临,机体和细胞对于体内激素的反应更敏感。地塞米松对体外培养的不同月龄大鼠成骨细胞 ER 蛋白水平的影响出现了上调、下调的两种不同反应如何解释。推测其原因:新生大鼠各项生理功能和激素等调节机制很不完善,各种理化因素易影响细胞的生理功能和代谢,从而使细胞功能受抑制,甚至基因的表达也受到抑制,导致各种蛋白质的合成受到抑制。当外源性塞米松作用时,ER 蛋白水平降低。随着大鼠生长发育逐渐成熟,各项生理功能逐渐完善,尤其是激素调节机制的完善,机体和细胞能通过各种途径的调节耐受一定范围的内外环境的变化,使细胞功能及基因表达趋于稳定,使各种内外环境的变化趋向对机体有利的方向变化,从而 ER 水平在受糖皮质激素影响时出现上调。综上所述:地塞米松对成骨细胞 ER 水平的影响可能与大鼠的生长发育时期,激素调节状态,以及不同时期大鼠基因表达的调控不同有关。根据中心法则,是否可以这样说:地塞米松对体外培养的不同月龄大鼠成骨细胞 ER 的蛋白水平的不同影响与不同时期大鼠基因表达的调控不同有关,与不同时期管家基因对基因的调控不同有关。

那么,地塞米松如何影响 ER 水平的呢?尚无相关报道。推测其原因可能为:一是转录水平以上的调节:主要是 ER 基因活化或抑制,包括细胞凋亡;二是转录水平以下的调节:ER 蛋白合成受抑制;三是调节细胞生化反应水平,导致细胞生理功能的改变,从而影响 ER 水平。以上推测包含极其复杂的生化反应,基因调控机制,细胞因子的相互作用,须进一步实验证明,如采血检测雌激素水平作对照,ER 在地塞米松影响下的 RT-PCR 检测,成骨细胞的功能检测,以及糖皮质激素对成骨细胞其他蛋白质、细胞因子的影响和糖皮质激素有作用的基因组的检测。本实验结果提示地塞米松对体外培养的大鼠成骨细胞 ER 蛋白水平的影响与月龄有关,其机制有待进一步研究。

【 参 考 文 献 】

- [1] Bonnie J, Deroo, Kenneth S, Korach. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116(3): 561-570.
- [2] Scutt A, Bertram P, Brautigam M. The role of glucocorticoids and prostaglandin E2 in the recruitment of bone marrow mesenchymal cells to the osteoblastic lineage: positive and negative effects. *Calcifield Tissue International*, 1996, 59(3): 154-162.
- [3] Eriksen, Colvard E, Berg K, et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like Cell. *Science*, 1988, 241(4861): 84-87.
- [4] 余敦敏,章秋. 雌激素受体基因与绝经后骨质疏松. *安徽医药*, 2005, 9(4): 241-243.
- [5] Lia Ginaldi, Maria Cristina, Di Benedetto, et al. Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immunity & Ageing*, 2005, 2(1): 14-19.
- [6] Smith E, Frenkel B. Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3 β -dependent and -independent manner. *J Biol Chem*, 2005, 280(3): 2388-2394.
- [7] 杨林,陶天遵,刘枫晨,等. 地塞米松对成人成骨细胞增殖和分化影响的实验研究. *中华骨科杂志*, 2001, 21(8): 493-497.
- [8] Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, et al. Extracellular calcium (Ca^{2+} (o))-sensing receptor in a murine bone marrow-derived stromal cell line (ST2): potential mediator of the actions of Ca^{2+} (o) on the function of ST-cells. *Endocrinology*, 1998, 139(8): 3561-3568.
- [9] Anita G, Marry GM, Gloria G. Estrogen prevents Glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblasts *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology*, 1999, 140(11): 5339-5347.
- [10] Hofbauer LC, Gorif, Riggs BL, et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology*, 1999, 140(10): 4382-4389.
- [11] 陶树清,潘宣超,荣杰生,等. 转化生长因子 β 对大鼠成骨细胞雌激素受体表达的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2005, 11(3): 302-305.
- [12] 张维成. 不同浓度地塞米松对骨髓基质细胞成脂、成骨分化的影响. *中国临床康复*, 2006, 10(29): 98-100.

(收稿日期: 2006-12-07)