

17- β 雌二醇对不同月龄大鼠成骨细胞雌激素受体 β 表达的影响

张国峰 陶树清 聂雷生 刘慧雯 陶天遵

摘要: **目的** 探讨 17- β 雌二醇对不同月龄大鼠成骨细胞雌激素受体 β (ER β)表达的影响。**方法** 雌性大鼠颅盖骨经多次酶消化、反复贴壁法分离纯化培养得到大量纯净成骨细胞并进行形态学检查和碱性磷酸酶(ALP)染色;免疫组化法(SABC)进行雌激素受体染色;用 10^{-8} mol/L 17- β 雌二醇处理培养的成骨细胞,SDS-PAGE 电泳和 western blot 法检测雌激素受体。**结果** 成骨细胞碱性磷酸酶染色阳性率为 90% 以上。形态学检查符合成骨细胞的特征。免疫组化染色显示大鼠的成骨细胞存在雌激素受体 β ,且位于胞核内。Western blot 结果表明,与对照组相比,处理组的各月龄大鼠雌激素受体 β 表达均有上调。**结论** 17- β 雌二醇能提高各月龄组大鼠成骨细胞雌激素受体 β 表达水平,不同月龄间上调水平不同,以 4、8 月龄组最为显著。

关键词: 雌激素受体 β ; 成骨细胞; 17- β 雌二醇

The effect of 17 β -estradiol on the estrogen receptor β expression in osteoblasts of rats at different months *in vitro* ZHANG Guofeng, TAO Shuqing, NIE Leisheng, et al. Department of Orthopaedics, The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of 17 β -estradiol on the expression of estrogen receptor β in osteoblasts of rats at different months. **Methods** A large amount of pure osteoblasts collected from cranial bones of female rats with many times enzyme digestion and repetitive adhesion method were isolated and cultured. Osteoblasts were confirmed by morphology and alkaline phosphatase staining. The estrogen receptor β was stained by immunohistochemistry, and then detected by western blot analysis and SDS-PAGE both in treatment groups (treated with 17 β -estradiol at a concentration of 10^{-8} mol/L) and in control groups. **Results** The positive cell rate of alkaline phosphatase staining was more than 90%. The morphology is consistent with osteoblast. The estrogen receptors β was detected in the nuclear of rat osteoblasts by immunohistochemical staining. The consequence of western blot analysis showed that 17 β -estradiol could enhance the estrogen receptor β expression in osteoblasts when compared with control groups. **Conclusions** 17 β -estradiol could enhance the estrogen receptor β expression in rat's osteoblast, especially, in 4 and 8 months group, however, the expressions were different in rat's osteoblasts at different months.

Key words: Estrogen receptor β ; Osteoblast; 17 β -estradiol

17- β 雌二醇(17 β -E₂)属于类固醇激素,通过细胞内雌激素受体发挥作用。绝经后骨质疏松症(PMOP)是一种与雌激素缺乏直接相关,同时又与遗传因素和多种后天性因素关联,以骨量减少、骨组织

微结构破坏为特征,导致骨脆性增加,强度降低和易于骨折的代谢性骨病。雌激素替代治疗(HRT)是目前防治本病的常用方法,但激素作用的细胞机制尚未完全阐明。雌激素受体在骨质疏松及骨代谢活动中起重要作用。本研究旨在通过分子生物学手段,探讨 17- β 雌二醇对不同月龄大鼠成骨细胞雌激素受体 β 表达的影响,为揭示雌激素受体的调控机制及其影响骨代谢的发生机制提供实验依据。

基金项目:黑龙江省“十五”攻关项目(G00C190702)

作者单位:150086 哈尔滨,哈尔滨医科大学第二临床医院骨二科(张国峰、陶树清、聂雷生、陶天遵);哈尔滨医科大学组胚教研室(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

健康新生、2、4、8、12 个月龄雌性 wistar 大鼠各 6 只,取材后收集成骨细胞,传代培养,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,将该细胞悬液按月龄组分成 2 组,一组为空白组,另一组为 17- β 雌二醇干预组。

1.2 材料与试剂

II 型胶原酶(SIGMA),DMEM/F 12(Hyclong),胎牛血清(TBD),17- β 雌二醇(SIGMA),碱性磷酸酶染色试剂盒(中生北控),SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士德公司),丙烯酰胺,N,N-二亚甲双丙烯酰胺,SDS,二硫苏糖醇(DTT),Tween 20,一抗、二抗(武汉博士德公司),TEMED,苯甲磺酰氟(PMSF),Western-blot 荧光显色试剂盒(上海申能博采)。

1.3 研究方法

1.3.1 大鼠成骨细胞体外分离与培养:将雌性 wistar 大鼠处死后,75%酒精中浸泡消毒 10 min,无菌条件下取颅骨松质骨,剪成 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 大小后放入含有青霉素和链霉素溶液处理 15 min,PBS 液充分冲洗至骨粒发白,以去除血细胞成分及骨膜等结缔组织。骨碎片放入 10 mL 离心管加入 0.25%胰蛋白酶于 37℃水浴箱内震荡消化 20 min,弃去上清液,再用 10 倍体积的 1 mg/mL II 型胶原酶于 37℃水浴箱内震荡消化 30 min,弃去上清液,再以 10 倍体积的 1 mg/mL II 型胶原酶于 37℃水浴箱内震荡消化 60 min,消化结束后去除骨碎片,上清液过 200 目钢丝网,在 4℃以 1000 r/min 离心 8 min,弃上清,沉淀加入培养液,细胞计数后调整浓度为 1×10^6 /mL 移入 25 cm^2 培养瓶中,在 5% CO_2 ,37℃饱和湿度条件下的恒温箱中孵化,培养液 24 h 内小半量或半量换液,以后每 2 d 更换 1 次;当细胞长满瓶底后,用 0.25%的胰蛋白酶消化,按 1:2 做传代培养。

1.3.2 体外培养成骨细胞的纯化:用反复贴壁法去除成纤维细胞。将细胞悬液在培养前先接种到玻璃培养瓶内,静置 10 min 左右,重复此过程 2~3 次,最后仍悬于培养液中的即为纯化的成骨细胞。

1.3.3 大鼠成骨细胞的特征性鉴定:①形态学观察:采用倒置相差显微镜每日观察成骨细胞的生长情况及形态特征;②碱性磷酸酶(ALP)染色:载玻片经多聚赖氨酸处理,贴片生长,经固定、滴加 ALP 染色液、封固、测出 ALP 阳性细胞;③大鼠成骨细胞雌激素受体的免疫组织化学染色显微镜观察分析:载玻片经多聚赖氨酸处理,贴片生长,经丙酮 4℃固

定、封闭、依次滴加一抗 37℃孵育 1 h、二抗 37℃20 min、SABC 37℃20 min、DAB 显色、苏木红轻度复染。

1.3.4 17- β 雌二醇干预实验^[1]:汇片后用含有 0.1%牛血清白蛋白(BSA)的无血清 MEM 培养液预培养 24 h,用 10^{-8} mol/L 的 17- β 雌二醇干预 24 h,空白对照组不加入干扰药物,只采用含有 0.1%牛血清白蛋白(BSA)的无血清 MEM 培养液,分别提取蛋白质。

1.3.5 成骨细胞雌激素受体蛋白质的检测采用蛋白质印迹检测法,即 Western-blot 法^[2]。提取的蛋白质经 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭、滴加 1:200 的一抗、1:500 的二抗、化学发光、显影、定影、凝胶图像分析。

1.3.6 统计学处理:数据用 SPSS 10.0 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 成骨细胞鉴定

2.1.1 一般形态学观察:原代细胞贴壁前呈均匀一致的球形,细胞周围有光晕,细胞核偏于一侧,可见清晰的核仁;8~24 h 后开始贴壁,48~72 h 完全贴壁伸展,呈饱满多角状,呈多个集落。随着培养延长,细胞伸出较多突起,有的突起相互连接,培养两周细胞融合成片,细胞形态为单核梭形,胞浆丰富,呈“铺路石”样排列。约 10~15 d 进入快速生长期,约 15~20 d 细胞融合,当细胞重叠复层生长,部分细胞脱离瓶壁,萎缩成圆球状,漂浮于培养液中。新生组贴壁提前及生长速度较快,而老龄组贴壁较慢及生长速度较慢,见图 1、2。

2.1.2 碱性磷酸酶(ALP)染色(碱性磷酸酶试剂盒):经化学染色后,镜下见 90%以上的细胞呈 ALP 染色阳性,见图 3。

2.1.3 大鼠成骨细胞雌激素受体的免疫组化分析(SABC 法):可见细胞核被染成棕褐色的阳性细胞,见图 4。

2.2 成骨细胞雌激素受体 β 蛋白质的检测(Western-blot 法)

空白组的雌激素受体 β 表达在新生组及 2 月龄组呈低度表达,4 月龄组表达呈上升趋势,8 月龄组雌激素受体 β 表达至高峰,而 12 月龄组呈下降趋势。 10^{-8} mol/L 的 17- β 雌二醇干预组,对各月龄大鼠的雌激素受体 β 表达均有上调,新生组及 2 月龄组表达上调水平不高,以 4、8 月龄组表达上调水平较高,12 月龄组的表达也上调。除新生、2 月龄组外

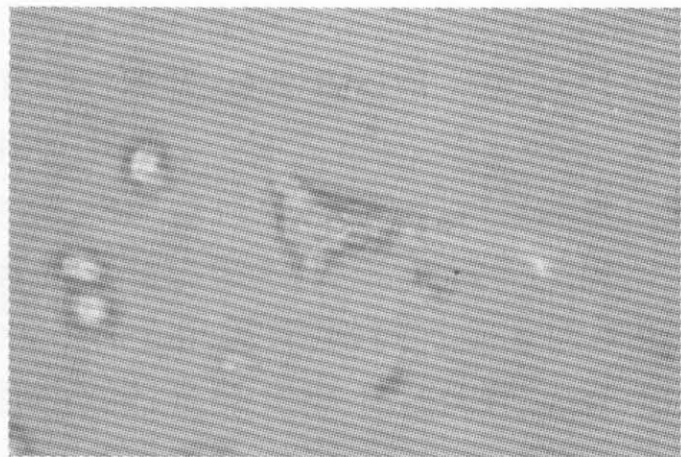


图 1 接种后 24 h 部分成骨细胞 电镜 40 × 10

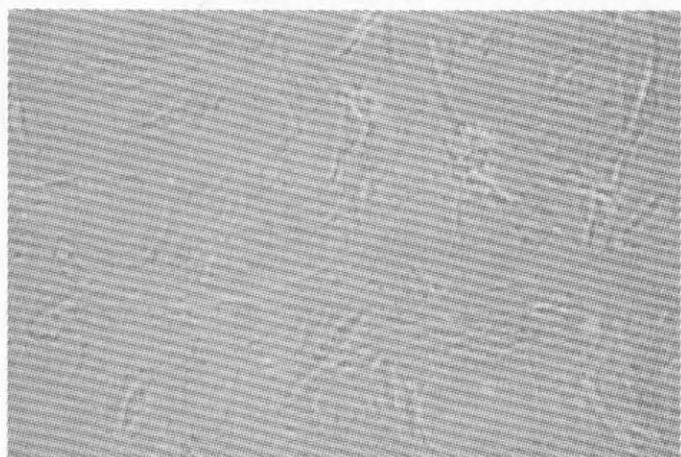


图 2 接种后 10 d 成骨细胞 电镜 20 × 15

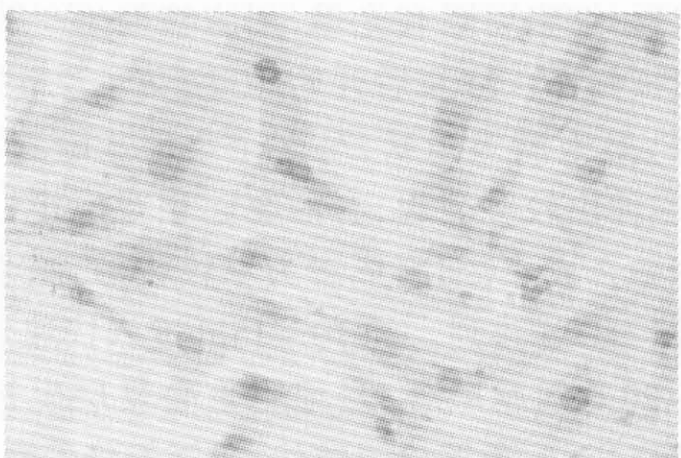


图 3 成骨细胞碱性磷酸酶染色 电镜 40 × 10



图 4 成骨细胞 ER 免疫组化染色 电镜 40 × 10

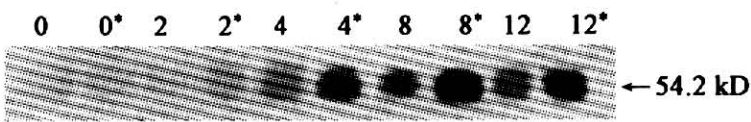


图 5 成骨细胞 ER β 表达电泳检测结果
注:0、2、4、8、12 为空白组各月龄;0*、2*、4*、8*、12* 为 17- β 雌二醇干预组各月龄

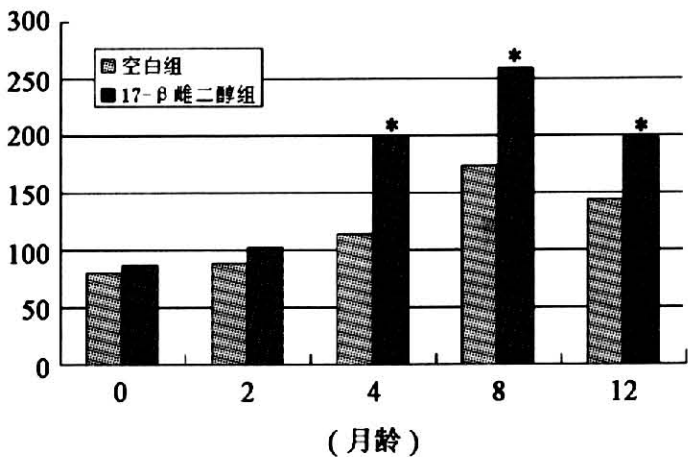


图 6 空白组与 17- β 雌二醇干预组 Western Blot 检测结果
注:与空白组比较 * $P < 0.05$

外培养成骨细胞获得成功至今经历了 40 余年的发展历史,其间方法不断更新、完善。在本实验改良上述方法,先用胰蛋白酶消化骨基质并将消化出残留的血细胞、成纤维细胞弃掉,再用胶原酶消化。可以解决老龄鼠在细胞培养及提取都比低月龄鼠难度加大的问题,本实验结果显示,此方法可以得到足够数量成骨细胞。以培养的成骨细胞作为研究模型是用来研究骨代谢和成骨机制的重要手段。从松质骨组织分离、纯化得到大量高纯度且保持正常功能的原代成骨细胞作为研究对象最符合正常生理状态,但原代细胞培养纯度不高,为此我们采用多次酶消化、反复贴壁法分离纯化培养得到大量纯净成骨细胞并进行形态学检查和碱性磷酸酶染色,结果证明采用此方法得到的细胞群符合成骨细胞的特征。

1988 年,Eriksen 等^[4]在体外培养的成骨细胞样细胞系中检测出雌激素受体(estrogen receptor),提出雌激素可能作用于成骨细胞上的雌激素受体从而影响骨代谢,传统的雌激素受体称为 ER α 。最近研究发现雌激素受体存在第二种亚型,命名为 ER β ^[5]。ER β 和 ER α 在组织分布及表达数量上存在差异,并发现大鼠和人类骨组织中 ER β 表达占优势^[6,7]。ER β 在松质骨表达水平明显高于皮质骨并且 ER β 水平在雌雄大鼠中相等。雌激素通过 ER β 介导在骨中所扮演的角色是理解绝经后骨质疏松发病机制的基础。雌激素对成骨细胞的作用取决于细胞所处的时期及 ER α 和 ER β 表达的相对量,青年人的成骨细胞以表达 ER α 为主,老年人的成骨细胞以表达 ER β

各月龄组空白组和 17- β 雌二醇干预组差异有显著性,具有统计学意义, $P < 0.05$ 。见图 5、6。

3 讨论

成骨细胞是来源于原始间叶组织的细胞,其体外培养从 1964 年 Peck 等^[3]用胰原酶消化骨组织,体

为主,成骨细胞细胞分化,增殖的不同时期,表达 ER α 量和特性也有区别,在基质成熟期,ER α 表达量高,基质矿化期,ER α 表达量下降,而 ER β 的表达量较恒定^[8]。刘博等^[9]对不同月龄雌性 wistar 大鼠成骨细胞内雌激素受体进行 Western-blot 分析证实 1、2 个月组 ER 荧光强度低表达,3 个月组 ER 荧光强度虽然呈低表达但已经显示出上升趋势,4 个月组以后 ER 荧光强度表达逐渐升高,至 8、9、10 个月 ER 荧光强度表达至高峰,11 个月组之后各组 ER 表达荧光强度呈下降趋势。Nilsson 等^[10]运用免疫组化方法对出生后 1~10 周的雌性大鼠骺板内雌激素受体水平进行检测,得出在早期雌激素受体表达水平很低,在 10 周时候仅有轻度的增高。Van der Eerden 等^[11]通过 RT-PCR 和免疫组化检测 10 月龄以内的雌性大鼠骺板 ER 表达,实验数据提示 ER α 和 ER β 两者表达水平是受荷尔蒙调节的,雌激素受体的表达与雌激素水平应该是相一致的。

在本实验中,经过 Western-blot 分析证实,在各月龄雌性大鼠的成骨细胞中均有 ER β 表达,但基础表达量很低,与文献报道^[12]的 60-2400 ER/细胞相符。空白组的 ER β 表达在新生组及 2 月龄组呈低度表达,4 月龄组表达呈上升趋势,8 月龄组 ER β 表达至高峰,而 12 月龄组呈下降趋势。17- β 雌二醇干预组,在各月龄大鼠的 ER β 表达均有上调,新生组及 2 月龄组表达上调水平不明显,以 4、8 月龄组表达上调水平较明显,12 月龄组的表达上调,但不如 4、8 月龄组。除新生组、2 月龄组外各月龄组空白组和 17- β 雌二醇干预组差异有显著性,具有统计学意义 ($P < 0.05$)。在雌性大鼠一生中雌激素受体的表达量很低,尤其是新生鼠期至 2 月龄雌激素受体水平更是非常低,并且在新生及 2 月龄雌性大鼠体内雌激素受体的调控机制尚未健全,所以雌激素对雌激素受体的上调幅度较低;而其后 4、8 月龄组大鼠处于性成熟期,体内雌激素有一定水平,相当于绝经后雌激素受体水平也增高,雌激素受体的调控机制逐步健全,对雌激素的调控敏感;12 月龄组其体内各器官趋向衰竭,雌激素及雌激素受体的减少导致雌激素对雌激素受体的上调幅度较 4、8 月龄组低,可提示在此期临床上用雌激素替代疗法治疗绝经后骨

质疏松症不会有显著疗效。这些结果表明,对成骨细胞雌激素可以影响雌激素受体的活性并对自身受体的表达进行调控,但不同月龄的 ER β 表达调节模式及程度可能会不同。雌激素影响 ER β 表达的具体调节机制仍有待进一步研究。现已证实破骨细胞和成骨细胞通过生物偶联机制维持着骨代谢的平衡,而且破骨细胞中也被发现存在雌激素受体,那么破骨细胞中雌激素受体的表达在不同月龄雌性大鼠表达规律如何,在雌激素的干预下其表达如何受影响,有待于进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] 廖二元,苏欣,罗湘杭. 17 β -雌二醇对 MG 63 细胞和正常人成骨细胞雌激素受体 β 表达的上调作用. 中华内分泌代谢杂志, 2003, 19(3): 240-241.
- [2] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼蒂斯, 主编. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996. 888-902.
- [3] Peck WA, Birge ST. Bone cells: biochemical and biological studies after enzymatic isolation. Science, 1964, 146: 1476.
- [4] Eriksen, Colvard E, Berg K, et al. Evidence of estrogen receptors innormal human osteoblast-like. Cell, Science, 1988, 241: 84-87.
- [5] Kuiper GG, Enmark E, Peltto-Huikko M, et al. Cloning of a novelestrogen receptors expressed in rat prostate and ovary. Proc Nat AcadSci USA, 1996, 93: 5925-5930.
- [6] Pelletier G. Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primae tissues. Histol Histopathol, 2000, 15: 1261-1270.
- [7] Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cell. Endocrinology, 1999, 140: 4367-4370.
- [8] 廖二元, 谭利华, 主编. 代谢性骨病学. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 170-172.
- [9] 刘博, 陶树清, 尹文哲. 雌性大鼠成骨细胞内雌激素受体表达的研究. 哈尔滨医科大学学报, 2004, 2: 179-181.
- [10] Nilsson O, Abad V, Chrysis D, et al. Estrogen receptor-alpha and-beta are expressed throughout postnatal development in the rat and rabbit growth plate. J Endocrinol, 2002, 173(3): 407-414.
- [11] Van der Eerden BC, Gevers EF, Lowik CW. Expression of estrogen re-ceptor alpha and beta in the epiphyseal plate of the rat. Bone, 2002, 30(3): 478-485.
- [12] Lim SK, Won YJ, Lee HC, et al. A PCR analysis of ER α and ER β mRNA abundance in rats and the effect of ovariectomy. J Bone Miner Res, 1999, 14: 1189-1196.

(收稿日期: 2006-12-07)