

去势大鼠骨髓细胞 IL-6 基因表达及骨组织学变化观察

周胜虎 刘兴炎 白孟海 葛宝丰 薛云

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)01-0028-03

摘要:目的 观察去势大鼠骨髓细胞白细胞介素-6 基因表达和骨组织学的变化。方法 健康 3 月龄雌性 SD 大鼠 48 只, 24 只作为假手术对照组, 24 只手术切除双侧卵巢。分别于去卵巢后 4、6、8、12 周取去势组和对照组各 6 只大鼠骨髓细胞提取 RNA(左侧股骨)。PCR 方法检测 IL-6 基因表达和骨组织学(右侧股骨)观察。结果 术后 4 周, 实验组骨髓细胞 IL-6 基因均呈弱表达, 6 周呈强表达, 8 和 12 周表达水平较峰值下降, 但仍高于对照组。去势后对照组各时间段 IL-6 基因表达水平未见变化。术后 4、6 和 8 周实验组骨组织学未见明显变化, 12 周骨髓腔扩大, 骨皮质变薄, 骨小梁变细, 见断裂现象。结论 绝经后骨质疏松的发生与 IL-6 基因水平增强有一定的关系。

关键词: 去势大鼠; 白细胞介素-6; 基因表达; 骨质疏松; 骨组织学

Observation of the expression of interleukin-6 gene in bone of ovariectomized rats and the change of bone tissue

ZHOU Shenghu, LIU Xingyan, BAI Menghai, et al. PLA General Hospital of Lanzhou, Lanzhou 730050, China

Abstract: **Objective** To observe the expression of Interleukin-6 gene in bone of ovariectomized rats and the change of bone tissue. **Methods** Forty-eight SD rats were randomly divided into 2 groups: Sham-operated control group(N) and ovariectomized group(OVX). At the end of week 4, 6, 8 and 12 after ovariectomy; RNA were collected from the rat femur bone marrow cells (left femur) of 12 rats, 6 from OVX group and 6 from N group. The expression of IL-6 gene was determined by PCR and the change of bone tissue (right femur). **Results**

Four weeks after the surgery, IL-6 gene expression of bone marrow cells declined in experiment groups, but it peaked at 6th week. In 8th-12th weeks after ovariectomy, the gene expression declined, but still significantly higher than in control group. IL-6 gene expression did not change in different times in OVX. In 4th, 6th, 8th week after the surgery, the change of bone tissue was not obvious in experiment groups, at 12th week, changes of bone tissue section were observed: thinner cortical plate and fracture of bone trabecula. **Conclusions** Postmenopausal osteoporosis may be related to the increase of IL-6 gene expression.

Key words: Ovariectomized rats; Interleukin-6; Gene expression; Osteoporosis; Bone tissue

骨质疏松是一种老年性常见病, 绝经后骨质疏松的发生主要与增龄所致的体内性激素突然减少及生理性退变有关。雌激素缺乏是导致骨吸收亢进的主要原因。现代研究表明骨髓微环境中某些细胞因子如白细胞介素-6(IL-6)水平升高在雌激素缺乏所致骨丢失中起着重要作用^[1,2]。本研究观察大鼠去卵巢后不同时期骨髓细胞 IL-6 基因表达水平和骨

组织学的变化。

1 材料和方法

1.1 去势大鼠模型的建立及分组

健康 3 月龄雌性 SD 大鼠 48 只, 体重 200 ~ 220g (本院动物实验科提供, 动物合格批号: SCXK-00-0012, 饲养于本院动物实验科, 标准固体饲料喂养, 饮用兰州自来水, 明 12h/暗 12h。随机分为假手术组和实验组, 每组 24 只。实验组经腹手术切除双侧卵巢。分别于去卵巢后 4、6、8 和 12 周取每组各 6 只大鼠股骨骨髓细胞提取总 RNA(左侧)和进行股

基金项目: 全军科研基金课题资助项目(01Z2008)

作者单位: 730050 兰州大学医学院(周胜虎); 兰州军区兰州总医院骨科(刘兴炎、白孟海、葛宝丰、薛云)

通讯作者: 刘兴炎, Tel: (0931) 8975278

骨组织学观察(右侧)。术时均予 3% 戊巴比妥钠溶液按 0.1 ml/100 g 体重腹腔麻醉。

1.2 主要试剂和仪器

3% 戊巴比妥钠(上海化学试剂采购供应站分装厂), IL-6 引物合成(大连宝生物), Taq 酶(美国 Roche), PCR 扩增仪明基 96G(杭州生产)。

1.3 骨髓细胞基因表达检测

细胞总 RNA 于术后 4、6、8 和 12 周采用 Trizol (Promega) 一步法分别提取两组骨髓细胞总 RNA, 将 RNA 的浓度调至 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 备用。取 2 μl 总 RNA 进行反转录, 反应体系含 5 $\times$ Rtbuffer 5 μl , 200 U/ μl 的 MMLV-RTM 酶 1 μl , Rnasin 1 μl , 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 Oligo(dT) 1 μl , 10 nmol/L 的 dNTPs 4 μl , 加入去 DEPC 水补至 25 μl 。充分混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min。 - 20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 1 μl cDNA 作为模板于 25 μl 反应体系中进行 PCR(即聚合酶链反应, Polymerase chain reaction), 所用引物为: 上游引物: 5'-CCCAACAAGGAGGAGAAGT-3'; 下游引物: 3'-GGTATGAAGTGGCAAATCG-5' 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 进入 PCR 循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 结束反应。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。用 1% 琼脂糖凝胶, 取反应产物 8 μl 电泳, 溴化乙锭染色。利用凝胶成像系统(Bio-Rad Gel Doc 2000)中扫描, 分析各目的基因条带的光密度值。

1.4 骨组织病理学观察

将股骨(右侧)置 10% EDTA 溶液内脱钙, 取股骨远端沿髁间窝纵切 1.5 cm 的骨组织, 常规石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜观察。

2 结果

2.1 去卵巢后不同时间 IL-6 基因的表达

实验组术后 4 周骨髓细胞 IL-6 mRNA 呈弱表达, 6 周达到高峰(图 1), 8、12 周时 IL-6 基因表达开始从峰值下降。但仍高于对照组织。

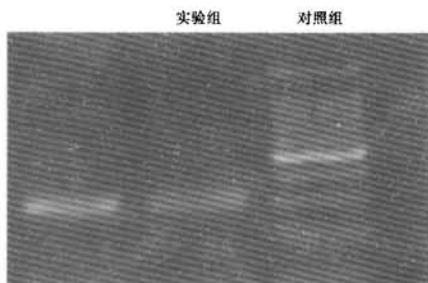


图 1 骨髓细胞 IL-6 基因表达

2.2 骨组织学观察结果

去卵巢后不同时间骨组织变化, 实验组术后 4、6 和 8 周与对照组织比较无明显变化, 12 周时实验组骨质变薄, 骨髓扩大, 骨小梁分布稀疏, 骨小梁变细, 见断裂现象(图 2)。对照组骨小梁粗细一致, 分布均匀, 无断裂现象(图 3)。

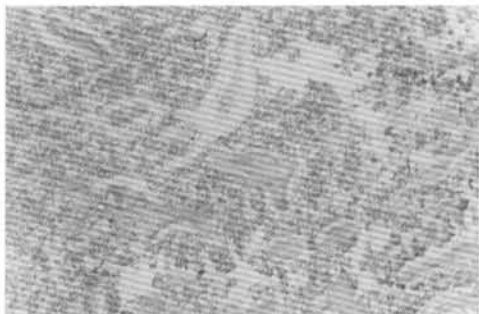


图 2 实验组, 骨髓腔扩大, 骨小梁变细, 骨小梁稀疏 HE $\times$ 200

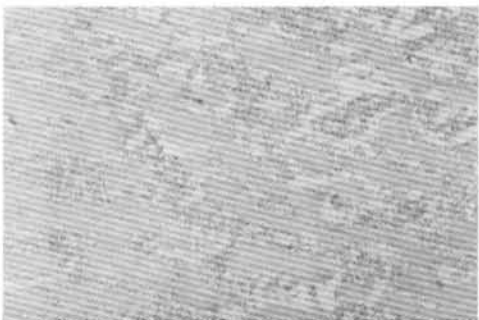


图 3 对照组, 骨小梁粗细均匀一致, 无断裂现象 HE $\times$ 200

3 讨论

绝经后骨质疏松症是目前发病率较高的骨代谢性疾病, 现在对其发病机制及药物治疗效果的研究多依赖于动物实验, 切除卵巢是复制骨质疏松模型的经典方法, 与临床绝经后骨质疏松极为相似。随着老年人雌性激素水平降低, 体内一些细胞因子分泌增多, 其中 IL-6 受雌激素的调节, 是导致绝经后骨质疏松最主要的细胞因子^[3]。

IL-6 作为人体内多种细胞分泌的一种多功能生物活性因子, 在骨组织中, 成骨细胞、骨细胞、破骨细胞、骨基质细胞、单核巨噬细胞均可分泌 IL-6 并增加破骨细胞形成和诱导破骨细胞活性增强, 介导各种激素和局部因子对破骨细胞发挥作用。早在 10 多年前人们就开始认识到 IL-6 是一个重要的促进破骨细胞分化增殖的因子^[4]。IL-6 即可以促进骨形成也可以促进骨吸收。IL-6 通过其受体发挥作用。骨形成蛋白-1 是反映了成骨细胞的活性的生化标

志物,该蛋白诱导新骨的形成。IL-6 和 IL-6 受体联合使用可显著提升大鼠成骨细胞骨形成蛋白-1 导致的碱性磷酸酶活性的升高以及促进骨形成蛋白-3 mRNA 的表达^[5]。IL-6 可通过破骨细胞上的受体直接作用于破骨细胞,也可以通过促进成骨细胞分泌细胞核因子 κ B 受体活化因子配基(RANKL)促进破骨细胞前体分化形成破骨细胞,提高破骨细胞的活性,促进骨吸收^[6]。雌激素能抑制造骨微循环环境中产生 IL-6,绝经后女性雌性激素水平下降会导致 IL-6 基因表达失控,血清 IL-6 水平升高,骨吸收增强,这也是绝经后骨质疏松症发病的原因之一^[7],有人报道雌激素替代治疗可以使血清 IL-6 水平下降^[8]。本研究以去卵巢大鼠作为绝经后骨质丢失模型,去除双侧卵巢后,大鼠体雌激素水平下降,IL-6 水平明显增加,而对照组血清 IL-6 水平变化较小。本实验观察到,去卵巢组不同时间骨髓细胞 IL-6 mRNA 水平表达在术后 4 周呈弱表达,6 周表达达最高峰,8 和 12 周 IL-6 mRNA 表达开始从峰值下降。

绝经后导致骨质疏松组织学变化主要是骨小梁结构改变和骨微结构破坏。本研究观察到,去卵巢组不同时间骨组织学变化,术后 4、6 和 8 周骨组织学观察与对照组比较无明显差别,术后 12 周去卵巢组骨皮质变薄,骨髓腔扩大,松质骨骨小梁变细,骨小梁数目减少,并见有断裂现象。骨组织学的变化与 IL-6 基因水平变化比较出现较晚,骨组织学变化发生在术后 12 周,推测绝经后骨质疏松症发生,先是 IL-6 基因水平增高,后骨组织发生变化。本研究

表明,大鼠去卵巢后可导致骨髓细胞 IL-6 基因水平表达增高,骨组织学发生异常变化,骨组织学变化较 IL-6 基因水平高表达晚,推测绝经后导致骨质疏松发生,首先是 IL-6 水平增高,之后是骨组织学发生改变。因此,绝经后骨质疏松的预防早期效果更加理想。

【参 考 文 献】

- [1] Pacifici R. Editorial: Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis the second decade. *Endocrinology*, 1998, 139: 2659-2661.
- [2] Manolagas SC, Jika RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. *N Engl J Med*, 1995, 332: 306-331.
- [3] 曾天舒,陈璐璐,夏文芳,等. 大鼠去卵巢后骨髓源性破骨细胞形成的动态变化及其与骨髓 IL-6、IL-6 受体表达的关系. *中国骨质疏松杂志*, 2003, 9(4): 291-294.
- [4] Jika RL, Hangoc G, Girasole G, et al. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*, 1992, 257: 88-91.
- [5] Yeh LG, Zavala MC, Lee JC. Osteogenic protein-1 and interleukin-6 with its soluble receptor synergistically stimulate rat osteoblastic cell differentiation. *J Cell Physiol*, 2001, 190: 322-331.
- [6] Kwan TS, Padrine M, Theoleyre S, et al. IL-6, RANKL, TNF- α /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, 15: 49-60.
- [7] 马文松,刘磊,朱小弟,等. 骨质疏松血清 IL-6 与骨代谢生化指标的变化. *中国骨质疏松杂志*, 2002, 8: 326-327.
- [8] 张星光,吕肖锋,李艳玲,等. 普萘洛尔对去卵巢大鼠骨密度及血清 IL-6 的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2004, 10(1): 85-86.

(收稿日期 2007-06-13)