

骨质疏松激素模型中肝脏铁调素基因表达变化的研究

王冰 徐又佳 马勇 张鹏 赵东阳 钱忠明

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)05-0299-04

摘要:目的 通过建立 SD 大鼠激素型骨质疏松模型,研究肝脏铁调素(hepcidin)基因表达在模型形成过程中的变化趋势,探讨其与骨质疏松形成的相关性。方法 选 SD 大鼠 80 只,按随机法分为实验组和对照组,分别为 40 只。实验组于每周第 1、4 天肌肉注射地塞米松(0.25 mg/100 g),连续 6 周建立大鼠骨质疏松模型,对照组用等量生理盐水肌注。实验组和对照组都用 RT-PCR 法观察第 14、21、24、28、31、35、38、42 天肝脏铁调素的基因表达。结果 与对照组相比,实验组大鼠肝脏铁调素基因表达在不同时间点存在明显不同:实验组第 17 天铁调素表达量明显上升,第 21 天至 38 天呈水平波动,第 38 天至 42 天又呈现显著上升。结论 模型中肝脏铁调素基因的表达升高与骨质疏松的形成存在一定的联系,为临床上研究骨质疏松症的发病机制和诊断指标提供了新的依据。

关键词: 铁调素;骨质疏松;肝脏;激素;RT-PCR

The analysis of expression of liver hepcidin gene of SD rats osteoporosis model in hormone WANG Bing, XU Youjia, MA Yong, et al. Department of Orthopaedics, The Second Hospital Affiliated to Suzhou University, Suzhou 215004, China

Abstract: **Objective** We establish osteoporosis models of hormone SD rats, in order to detect the tendency of expression of liver hepcidin gene in the formation process of rats osteoporosis model and investigate associations between hepcidin and osteoporosis. **Methods** 80 SD rats were divided into experiment group and control group with 40 in each group. To i. m Dex 0.25 mg/100 g twice a week, so that the osteoporosis model in hormone was established after 6 weeks. To i. m the indetical ml saline with control group. Then we measured the expression of the liver hepcidin gene with RT-PCR on the 17th, 21st, 24th, 28th, 31st, 35th, 38th, 42nd Day. **Results** Compared with control group, hepatic hepcidin gene expression of test group on different stage had obvious differences. From model made to 17th day, hepcidin mRNA expression was obviously increasing. From 21st day to 38th day, contents of hepcidin remained unchanged. After 38th day, it obviously rose. **Conclusion** The high expression of liver hepcidin in model rats liver may have some relations with osteoporosis formation. Hepcidin may become a new diadynamic criteria in abnormal change of bone mineralization, and offer a new proof to the clinical research of osteoporosis.

Key words: Hepcidin; Osteoporosis; Liver; Hormone; RT-PCR

随着人类寿命的延长和人口出现老龄化,骨质疏松症(osteoporosis)的防治已经成为 21 世纪世界重要的卫生问题之一。近几年来越来越多的研究发现体内铁贮存与骨质矿化有着密切的联系。2005 年南

非学者 Schnitzler 等^[1]研究非洲黑人股骨颈骨折患者的骨质疏松情况时发现患者的骨密度(bone mineral density, BMD)与铁超载(iron overload)之间有密切的相关性。同年 Maurer 等^[2]在研究绝经女性骨质疏松治疗时也发现铁的摄入与骨的矿化密度呈正相关。在 2001 年由 Park 等^[3]从人尿中分离得到的铁调素^[4](hepcidin)在铁代谢中可作为激素样物质调节铁旁途径^[5]的吸收、利用、贮存和再利用(肝脏和巨噬细胞),因此,铁调素干预铁代谢、骨质疏松就成为一个很有价值的研究课题,那么在“铁调

基金项目:江苏省教育厅自然科学基金资助项目(05KJB320125) 苏州市国际合作计划(SWH0617) 苏州大学医学发展基金(EE126621) 江苏省“六大人才高峰”培养项目(07-B032)

作者单位:215004 苏州大学附属第二医院骨科(王冰、徐又佳、马勇、张鹏、赵东阳),香港理工大学应用生物化学系(钱忠明)

通讯作者:徐又佳,Email: xuyoujia@medmail.com.cn

素-骨质疏松”关系中最重要的是骨质疏松模型是否存在铁调素的相关变化,这也必是该研究假说的关键所在。

2006 年马勇等^[6,7]报道了维甲酸骨质疏松模型中存在肝脏铁调素基因表达的相关变化,但在临床实践的应用中,骨质疏松的病因不同,相应的模型制作方法也不同。为此,本研究将以激素型骨质疏松模型为材料,了解该模型中大鼠肝脏铁调素基因表达的变化,为丰富这一方面研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SD 实验大鼠 100 只(苏州大学动物中心提供),6 个月鼠龄,雌性,体重 220~260 g。随机分为 2 组:激素实验组 50 只,对照组 50 只。分组情况见表 1。

表 1 不同组别、不同时间大鼠的分组情况(只)

组别	1 d	7 d	14 d	21 d	24 d	28 d	31 d	35 d	38 d	42 d
实验组	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
对照组	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

1.2 模型制作方法

1.2.1 实验组:肌肉注射地塞米松 0.25 mg/100 g (体重),部位:大鼠后肢大腿,左右交替,时间:每周第 1 天和第 4 天,连续 6 周。

1.2.2 对照组:注射与实验组等量生理盐水,部位、时间与实验组完全相同。

两组动物注射后均分笼饲养,正常昼夜节律。

1.3 BMD 测定

1.3.1 设备:Discovery 全身双能量(X 射线)骨密度测定仪(美国 HOLOGIC 公司),由上海复旦大学附属中山医院提供。

1.3.2 时间:实验组和对照组大鼠分别于第 1、7、14、21、28、31、35、38 和 42 天测定。

1.3.3 方法:3.6% 水合氯醛腹腔麻醉后放置与骨密度仪下,应用小动物软件进行骨扫描,测定 BMD 值。

1.3.4 测定部位:大鼠 L₁ 椎体和股骨上 1/3。

1.4 肝细胞 Hecpudin 的 mRNA 表达

1.4.1 时间:本研究中由于模型骨密度在 14 d 前无显著差异,故实验组和对照组肝组织取材从 14 d 组开始,具体时间为第 14、21、24、28、31、35、38 和 42 天。

1.4.2 取材方法:3.6% 水合氯醛腹腔麻醉大鼠后先心脏放血,再予以 PBS 液心脏灌洗,取肝右叶组织 100 mg。

1.4.3 mRNA 表达方法 (1)RNA 抽提:将大鼠肝组织依次加入 Trizol 试剂、氯仿、异丙醇、75% 酒精,通过一系列操作得到总 RNA。通过紫外分光光度仪测定 A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 的吸光度(A 值),A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.7~2.1 之间,计算得到 RNA 的含量(μg/μl)。(2)逆转录:样本取 2 μg RNA,依次加入 Oligo(dT)15 primer、5 倍 buffer、10 mmol dNTPs、Rnasin、M-MLV RT,以总 RNA 为模板逆转录获得 cDNA,逆转录条件:70℃ 5 min 4℃ 5 min 42℃ 1 h。(3)PCR:取 cDNA 1 μl,加入 10 倍 buffer、25 mmol MgCl₂、10 mmol dNTPs、Hecpudin 引物、β-acti 引物、Taq 酶,进行 RT-PCR 反应获得 DNA,PCR 反应条件 94℃ 4 min 94℃ 45 s 60℃ 45 s 72℃ 1 min,循环 30 次,72℃ 5 min。引物序列见表 2。(4)电泳:取少量 DNA 做琼脂糖电泳获得 Hecpudin 和 β-actin 条带。

表 2 Hecpudin 和 β-actin 引物序列和扩增产物大小

基因	上游引物	下游引物	扩增产物 (bp)
Hecpudin	ACAGAAGGCAAGATGGCACT	GAAGTTGGTGTCTCGCTTCC	201
β-actin	GAGAGGGAAATCGTGCGTGAC	CATCTGCTGGAAGGTGGACA	457

注:Hecpudin 基因是目的基因 β-actin 基因是内参照

1.4.4 设备:匀浆机,高速低温离心机,分光光度仪,PCR 仪,FR-200 紫外与可见光分析装置。Trizol 试剂(Invitrogen 公司),Oligo(dT)15 primer,dNTP,Taq 酶,Rnasin,M-MLV RT(以上均是 Promega 公司)。

1.5 数据收集

骨密度:将各组数据收集后取平均值表达。

PCR 产物电泳:将各组电泳条带,通过 Smartview-2001 生物电泳图像分析软件进行吸光度分析,可得到实验组与对照组各个时间点 Hecpudin mRNA 的相对表达量。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 10.0 进行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行双样本均数间 t 检验,P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨密度

对照组大鼠的 BMD 从第 1 天至第 42 天基本呈现水平波动,前后组比较无明显差异(P>0.05),实验组大鼠的股骨与腰椎 BMD 与对照组同时间相比在 14 d 后开始出现有下降趋势,股骨上 1/3 BMD 下降明显(P<0.05),见图 1。而 L₁ 椎体的 BMD 下降更为显著(P<0.01),见图 2。

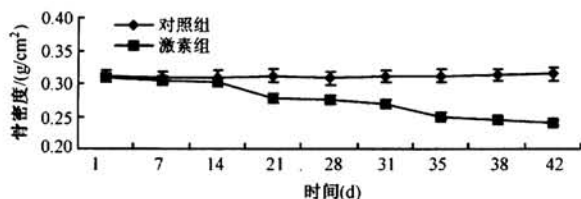


图1 激素组股骨 BMD 改变

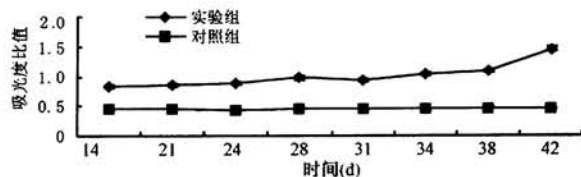
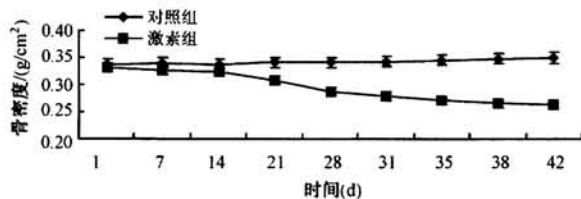
图5 不同组别不同时间肝细胞 Hepcidin 和 β -actin 的吸光度比值随时间的延长的变化

图2 激素组腰椎 BMD 改变

2.2 肝细胞 Hepcidin 的 mRNA 表达

对照组:第 14、21、24、28、31、35、38 和 42 天的 Hepcidin 的 mRNA 表达在 457 bp 凝胶电泳条带中亮度基本不变,无上升或下降,呈水平趋势,见图 3。实验组:Hepridin 的 mRNA 表达在 201 bp 凝胶电泳条带中从第 14 天开始亮度逐渐增加至第 42 天,呈逐渐升高趋势,见图 4。通过灰度扫描半定量分析各时间点肝细胞 Hepcidin 和 β -actin 的吸光度比值,对照组比值随时间的延长,各时间点之间无明显变化($P > 0.05$),在 0.430 至 0.464 水平。实验组吸光度比值随时间的延长逐渐增加,在 0.842 到 1.450 范围,与对照组各时间点相比存在明显差异($P < 0.01$),见图 5。

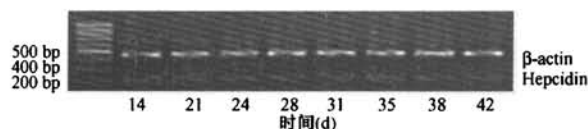


图3 对照组肝细胞 Hepcidin 的 mRNA 表达在凝胶电泳条带中亮度随时间的延长基本不变

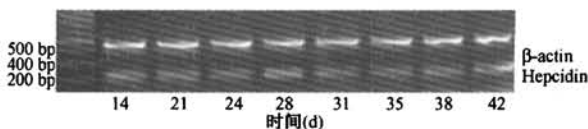


图4 实验组肝细胞 Hepcidin 的 mRNA 表达在凝胶电泳条带中亮度随时间的延长逐渐增加

3 讨论

作为骨质疏松症最主要研究载体的动物模型主要有去卵巢^[8]、激素注射^[9]和维甲酸灌胃^[10]3种造模方式。其中由于激素注射型造模周期短、成功率

高和骨质疏松表现典型,因此本实验选择激素型作为研究平台来探讨铁调素与骨代谢之间的联系更有临床意义。最新的一些研究发现铁代谢与 Ca^{2+} 存在着密切的联系,Gogvadze 等^[11]在 2002 年对肝细胞研究中发现 Fe^{2+} 能诱导大鼠肝细胞线粒体的钙离子瞬时释放。同时期在对于 K562 细胞的研究中,Musilkova 等^[12]和 Ci 等^[13]先后发现:细胞铁摄入很大程度受到胞内钙离子浓度的调节,胞内游离钙离子升高会加速铁摄入的初始效率,从而全面提高细胞铁摄入能力。而 Park 等^[13]发现的铁调素 (Hepcidin),使得对于铁代谢调节的认识有了突破性的进展。2002 年 Nicolas 等^[14]报道铁调素缺乏导致小鼠进行性组织铁积聚,而铁调素高表达的转基因鼠则出现严重的铁缺乏。Lin 等^[15]和 Truksa 等^[16]在 2007 年相继报道了铁调素与骨形成蛋白(BMP)2、4、9 之间存在着正相关,由此影响到骨代谢。徐又佳等^[17,18]和马勇等^[6,7,18]报道了在维甲酸型骨质疏松模型上铁调素改变的最新研究进展,证实了铁调素影响骨代谢。

所有这些研究均提示铁调素在机体铁代谢调节中起着重要的作用,可能与体内铁代谢存在相关。

通过前期的预实验以及本实验所做的大鼠骨密度(BMD)的测定发现:大鼠的 BMD 在激素注射后的第 14 天至第 21 天出现一个比较明显的下降趋势,见图 1、图 2。同时英国学者 Maden 等^[19]在 2002 年发现在大鼠中使用超生理剂量的糖皮质激素可直接抑制成骨细胞的活性,在使用后最早 10 d,最晚 48 周出现明显的骨丢失。因此本实验将肝细胞 Hepcidin 的 mRNA 测定时间选择从第 14 天开始,即与 BMD 下降的时间相一致,这样才能更为准确的观察到 Hepcidin 的 mRNA 表达变化。

激素型大鼠的肝组织 Hepcidin 的 mRNA 表达量与造模时间存在着一定的相关性。表现为 Hepcidin 的 mRNA 表达量随造模时间的延长也逐渐增加,呈现出逐渐上升的趋势,但又不是线性相关,而是分成 3 个阶段:①上升期:造模后开始至第 14 天, mRNA 表达量表现为明显的上升,吸光度比值从 0.452 上

升到 0.842 ($P < 0.01$)。②平台期:从第 14 天至第 38 天, mRNA 表达的上升趋势较前明显减慢,吸光度比值围绕在第 21 天的 0.864 处呈水平波动 ($P > 0.05$)。③上升期:第 38 天至第 42 天, mRNA 表达又呈现出显著的升高,吸光度比值从 1.090 上升到 1.450 ($P < 0.01$)。

同时研究发现对照组大鼠肝组织 Hcpcidin 的 mRNA 的表达量则并没有随时间的延长而改变,吸光度比值在 0.450 水平波动 ($P > 0.05$)。

大鼠肝脏细胞 Hcpcidin 的 mRNA 表达出现上述变化趋势可能存在以下解释:①在激素型骨质疏松模型的形成过程中出现肝细胞 Hcpcidin 的基因表达变化,充分证明了铁调素作为铁代谢调节重要因素与骨代谢异常疾病-骨质疏松症之间有一定的相关性。②实验结果显示铁调素与骨质疏松的程度之间存在正相关的联系,即骨质疏松程度越明显,铁调素的基因表达就越高。

马勇等^[5,6]对铁调素在维甲酸灌胃型大鼠骨质疏松模型的基因表达进行了研究,发现铁调素的基因表达也存在着变化趋势,但是其变化趋势与本研究不尽相同,这可能与以下因素有关:第一,激素型与维甲酸型相比,由于激素对于炎性因子有抑制作用,所以激素型受到炎性因子的影响更小,更接近于正常生理性骨质疏松症。第二,激素型的造模时间为 6 周,而维甲酸型造模时间只有 14 d,激素型造模时间远较维甲酸型长,所以激素型能使铁调素的基因表达更为完整和明显。第三,激素与维甲酸至骨质疏松机制不同,所以对 Hcpcidin 表达的影响也不相同,导致其表达也存在差异。

通过这个实验我们初步证实了铁调素与骨质疏松之间存在着一定的联系,但是这还不能作为确定骨质疏松的标准,只能作为一个可能存在的影响因素,因为与骨质疏松动物模型相比,人骨质疏松症的影响因素更多,也更为复杂。但是这个研究的发现对于我们将来应用铁调素作为干预铁代谢的手段,进而干预骨代谢提供了一定的依据,为进一步预防和治疗骨质疏松症提供了新的思路和方法。

【参 考 文 献】

[1] Schnitzler CM, Schnaid E, MacPhail AP, et al. Ascorbic acid deficiency, iron overload and alcohol abuse underlie the severe osteoporosis in black african patients with hip fractures-a bone

histomorphometric study. *Calcif Tissue Int*, 2005, 76: 79-89.

- [2] Maurer J, Harris MM, Stanford VA, et al. Dietary iron positively influences bone mineral density in post menopausal women on hormone replacement therapy. *J Nutri* 2005, 135: 863-869.
- [3] Park CH, Valore EV, Waring AJ, et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*, 2001, 276: 7806-7810.
- [4] 常彦中, 段相林, 钱忠明. Hepcidin 和铁稳态. *中华内分泌代谢杂志* 2003, 19(6): 501-504.
- [5] Mwanjewe J, Martfiez R, Agrawal P, et al. On the Ca^{2+} dependence of non-transferrin-bound iron uptake in PC12 cells. *Biol Chem* 2000, 275: 33512-33515.
- [6] 马勇, 徐又佳, 王爱东, 等. 大鼠骨质疏松模型中肝脏 Hcpcidin 基因表达的初步研究. *苏州大学学报(医学版)*, 2006, 26(3): 367-369.
- [7] 马勇, 徐又佳, 钱忠明, 等. 血清铁调素在骨质疏松模型中含量的观察. *中国血液流变学杂志* 2007, 17(2): 193-195.
- [8] 曾晓, 谢林, 姚共和. 去势雌性大鼠骨质疏松症模型的复制及相关指标测定. *浙江中医学院学报*, 1999, 23(4): 44-45.
- [9] 李卫平, 张艳, 明亮, 等. 糖皮质激素诱导骨质疏松大鼠模型研究. *中国药理学通报*, 1998, 14(5): 475-476.
- [10] 吴波, 徐冰, 黄添友, 等. 维甲酸致大鼠骨质疏松模型与机理研究. *药科学报*, 1996, 3(3): 241.
- [11] Gogvadze V, Walter PB, Ames BN. Fe^{2+} induces a transient Ca^{2+} release from rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 398: 198-202.
- [12] Musilkova J, Kovar J. Additive stimulatory effect of extracellular calcium and potassium on non-transferring ferric iron uptake by HeLa and K562 cells. *Biochem Biophys Acta* 2001, 1514: 117-126.
- [13] Ci W, Li W, Ke Y, et al. Intracellular Ca^{2+} regulates the cellular iron uptake in K562 cell. *Cell Calcium* 2003, 33: 257-266.
- [14] Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99: 4596-4601.
- [15] Lin L, Valore EV, Nemeth E, et al. Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood*, 2007, 110(6): 2182-2189.
- [16] Truksa J, Peng H, Lee P, et al. Different regulatory elements are required for response of hepcidin to interleukin-6 and bone morphogenetic proteins 4 and 9. *Br J Haematol* 2007, 139(1): 138-147.
- [17] 徐又佳, 钱忠明, 俞晨. 铁调素在骨质矿化中作用. *中国骨质疏松杂志* 2005, 11: 541-543.
- [18] 徐又佳, 马勇, 钱忠明, 等. 骨质疏松模型体内铁调(Hcpcidin)基因表达的相关研究. *中国骨质疏松杂志* 2007, 13: 686-691.
- [19] Allen SP, Maden M, Price JS. A foal for retinoic acid in regulating the regeneration of deer antlers. *Dev Biol* 2002, 251(2): 409-423.

(收稿日期: 2008-01-20)