

去势大鼠骨髓体外培养破骨细胞观察及 OPG mRNA 表达的变化

白孟海 葛宝丰 白洁 陈克明 赵红斌

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)04-0272-03

摘要:目的 观察去势大鼠骨髓源性破骨细胞形成的动态变化和骨髓细胞护骨素(OPG)基因的变化。方法 健康 Wistar 雌性大白鼠 60 只,分为实验组(去卵巢组)和对照组(假手术组),每组 30 只,分别于术后 2、4、6、8 和 12 周取去卵巢组和对照组每只大鼠股骨骨髓细胞进行细胞培养,左侧股骨培养细胞作瑞氏-吉姆萨染色和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色,观察破骨细胞并计数。右侧股骨培养细胞提取总 RNA,通过 RT-PCR 来观察去势大鼠骨髓细胞 OPG mRNA 表达强度变化。结果 术后 2、4 周去势组破骨细胞形成数多于同期对照组,6 周去势组破骨细胞形成达到高峰,显著多于同期对照组 $P < 0.01$ 。8 周去势组破骨细胞数较 6 周有所下降,但仍明显高于对照组。骨髓培养细胞 OPG mRNA 表达,术后 2、4 周 OPG mRNA 表达较同期对照组无明显差别,6 周去势组 OPG mRNA 表达明显低于对照组,8 周去势组 OPG mRNA 表达与同期对照组比较无明显差异。结论 大鼠去势后可引起破骨细胞形成数量增多和 OPG mRNA 表达降低,且均在术后 6 周表现明显。

关键词: 去卵巢大鼠;破骨细胞;护骨素;基因

Observation of bone marrow cells in ovariectomized rats and expression of osteoprotegerin mRNA BAI Menghai, GE Baofeng, BAI Jie, et al. The Institute of Orthopedics Lanzhou General Hospital, Lanzhou 730050, China

Abstract: **Objective** To observe the changes of bone marrow osteoclast formation and expression of OPG gene.

Methods 60 Wistar female rats were divided into experimental group (ovariectomized group) and control group (sham operating group). The bone marrow cells were cultured and TRAP staining were performed. RT-PCR was performed to detect the expression of OPG mRNA in ovariectomized rats. **Results** The number of the osteoclast formation was more than that in the contrast group, and it reached the peak at the 6th week after variectomy, which was significantly more than that in the contrast group ($P < 0.01$). The expression of osteoprotegerin mRNA in ovariectomized group was obviously lower than that in the contrast group at the 6th week. **Conclusion** The number of osteoclast formation in ovariectomized rats increased and expression of OPG mRNA decreased, which were all obvious at the 6th week after variectomy.

Key words: Ovariectomized rats; Osteoclast; Osteoprotegerin(OPG); Gene

绝经后骨质疏松症是严重危害妇女健康的严重疾病,以高骨转换为特征,表现为骨吸收大于骨形成,小梁骨大量丢失,其最终结果是骨量减少、骨密度减低以及骨组织微结构破坏,从而导致骨质疏松性增

加,易发生骨折。雌激素缺乏是导致骨吸收亢进的主要原因^[1],本研究观察成年大鼠去卵巢后不同时期骨髓源性破骨细胞分化增殖能力的动态变化及其骨髓细胞中 OPG mRNA 表达关系的研究。

1 材料和方法

1.1 大鼠去卵巢模型的建立

健康 3 月龄雌性 Wistar 大白鼠,体重 220 ~ 240 g,由本院动物实验科提供,随机分为实验组(切除双侧卵巢组)和对照组(假手术组)。每组 30 只。实验

基金项目:全军科研基金课题资助项目(01Z008)

作者单位:730050 兰州军区兰州总医院骨科研究所(白孟海、葛宝丰、陈克明、赵宏斌);兰州军区兰州总医院安宁分院检验科(白洁)

通讯作者:白孟海,Email: yinyingdebbie@126.com

组均行双侧卵巢切除术。术时均予 3% 戊巴比妥钠溶液按 0.1 ml/100 g 体重腹腔麻醉。手术腹侧入路完整切除双侧卵巢,止血缝合。对照组采用腹侧入路,仅切除少许皮下组织即关闭。分别于去卵巢后 2、4、6、8 和 12 周后取去卵巢组和对照组大鼠两侧股骨骨髓细胞作培养。

1.2 主要试剂和仪器

a-MEM (sigma) ,胎牛血清(FCS ,兰州民海) ,抗酒石酸酸性磷酸酶染色(TRAP)试剂盒购自中国医科院血液病研究所 ,RNA 抽提试剂盒 RNAsio、AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒、NTP Mixture、Taq 酶、100bp DNA Ladder Marker 均购自大连宝生物公司。

1.3 细胞培养

破骨细胞培养,参考夏文芳等^[2]方法,主要步骤包括:无菌操作下完整取下双侧股骨,剪断两端骨髓端,用 5 ml a-MEM(含 10% FCS ,100 U/ml 青霉素 ,100 mg/链霉素)反复冲洗骨髓腔 3 次,收集骨髓细胞悬液,将细胞调节浓度为 1×10^7 /ml 加入预先配好的培养体系,其内含有 20% FCS、VitD₃(10^{-8} M , sigma)混匀后加入预置盖玻片的 24 孔板内或直径 100 mm 培养皿内,24 孔板内培养细胞作破骨细胞染色和鉴定,培养皿内细胞提取总 RNA 作基因测定。置 CO₂ 培养箱,在 5% CO₂ 37 ℃ 条件下培养 3 d 换液 1 次,分别在 2、4、6、8 和 12 周后,取出玻片进行固定染色或提取总 RNA。

1.4 破骨细胞染色和鉴定

左侧股骨骨髓培养细胞作破骨细胞染色和鉴定,在培养的盖玻片上分别作瑞士-吉姆萨染色和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色,以 TRAP 染色(+),细胞核 ≥ 3 个核的细胞为破骨细胞标志。对每个随机视野中的破骨细胞进行计数。每组大鼠计数 10 张玻片,取均值,结果以细胞数/玻片表示。

1.5 骨髓培养细胞 OPG 基因表达的检测

右侧股骨骨髓细胞培养后提取总 RNA 作 OPG 基因测定,分别在培养的第 2、4、6、8 和 12 周,参照 Takara 公司试剂盒使用说明提取细胞总 RNA。RNA 溶解于 RNAase-free ddH₂O 液中 - 80 ℃ 保存。在 200 μ L 反应管(冰浴)中加入 RNA2 μ L(约 2.5 μ g), ligo (dT)I μ L , RNasin-free ddH₂O 至 12 μ L , RT-buffer 4

μ L , dNTP Mix 2 μ L , AMV Reverse Transcription 1 μ L , 混匀离心 3 s ,PCR 仪上进逆转录反应,反应条件: 42 ℃ 60 min ; 70 ℃ 10 min。在冰浴 PCR 管(含 10xPCR buffer 5 μ L ,dNTP Mixture 1 μ L)中加 cDNA 1 μ L ,上下游引物各 1 μ L(表 1) ,Taq 0.3 μ L ,加无菌蒸馏水至 50 μ L。混匀,瞬时离心,在 PCR 仪上反应,反应条件: 94 ℃ 30 s , 94 ℃ 30 s , 60 ℃ 30 s , 72 ℃ 30 s , 30 个循环后, 72 ℃ 延伸 5 min ,结束反应。PCR 产物 5 μ L 直接上样,在 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳。电泳条带在紫外灯下观察,并用凝胶成像仪器照相并分析灰度值,观察各基因的表达量。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物	序列
OPG	Sense	5'-TCCTGGACCTACCTAAAACAGCA-3'
	Antisense	5'-CTACACTCTCTGCATTTCACITTTGG-3'

1.6 统计学处理

各数值均采用 SPPSS 10.0 版本结果进行 t 检验,结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 破骨细胞变化

术后不同时期破骨细胞变化见表 2。术后 2、4 周去卵巢组骨髓源性破骨细胞形成数多于同期对照组,6 周去卵巢组破骨细胞显著多于对照组 $P < 0.01$ (图 1) 8 周去卵巢组破骨细胞形成数较 6 周下降,但仍明显高于对照组 $P < 0.05$ 。对照组全程骨髓源性破骨细胞数无明显改变。

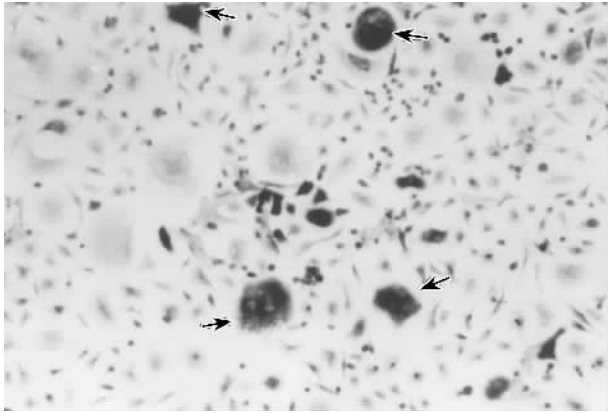


图 1 去卵巢组诱导培养出的破骨细胞
视野中见有多个破骨细胞,箭头示(TRAP 染色 $\times 40$)

表 2 去势大鼠体外培养不同时间骨髓源性破骨细胞形成数

组别	2 周(个/玻片)	4 周(个/玻片)	6 周(个/玻片)	8 周(个/玻片)	12 周(个/玻片)
实验组	11.48 $\pm$ 1.7	16.2 $\pm$ 4.23 *	24.56 $\pm$ 2.11**	17.23 $\pm$ 3.75 *	12.37 $\pm$ 2.23
对照组	7.21 $\pm$ 1.10	10.17 $\pm$ 5.16	11.54 $\pm$ 1.75	12.13 $\pm$ 1.30	10.27 $\pm$ 1.14

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.2 骨髓细胞 OPG 基因表达的变化

RT-PCR 半定量分析结果表明,大鼠切除卵巢后 2、4、8 和 12 周骨髓细胞中 OPG mRNA 表达与对照组相比差异无显著性,术后 6 周 OPG mRNA 表达与对照组比较明显减弱,见图 2。



图 2 实验组和对照组大鼠骨髓细胞 OPG 表达情况
(M:marker;O:切除卵巢组;S:假手术组)

3 讨论

骨代谢主要由成骨细胞和破骨细胞来完成,处在骨吸收和骨形成的动态平衡中,任何一个影响骨吸收或骨形成的因素都会引起骨量的变化,从而导致骨代谢失衡,如骨质疏松。随着对破骨细胞调节机制的研究突破,研究者开始对 OPG 在骨组织吸收中的作用进行研究。OPG 又称破骨细胞分化抑制因子,是细胞外调节破骨细胞分化成熟和骨吸收功能的关键因子,是骨形成、骨吸收的最终介质,该物质的异常将导致骨骼疾病^[3],本实验研究了大鼠去势后骨髓细胞 OPG 基因表达,实验结果显示,大鼠切除卵巢后 2、4、8 和 12 周骨髓细胞中 OPG mRNA 表达与对照组相比没有明显差异,术后 6 周 OPG mRNA 表达与对照组比较明显减弱。说明雌激素可影响 OPG 形成,从而影响骨代谢。

破骨细胞是骨吸收的直接参与者,破骨前体细胞的不断分化成熟和成熟破骨细胞的活化是骨吸收的前提。本实验参考夏文芳等方法^[2],在培养中加入 VitD₃ 诱导培养,对去势大鼠骨髓源性破骨细胞进行体外诱导培养。成功的诱导培养出大鼠骨髓源性破骨细胞,经 TRAP 染色计数显示,术后 2、4 周去卵巢组骨髓源性破骨细胞形成数多于同期对照组;6 周去卵巢组破骨细胞显著多于对照组,8 周去卵巢组破骨细胞形成数较 6 周下降,但仍明显高于对照组。对照组全程骨髓源性破骨细胞数无明显改变。

1,25(OH)₂D₃ 作为钙、磷代谢的重要调节激素,已被证实是破骨细胞分化成熟的主要激活因子,可诱导破骨前体细胞的形成及融合为成熟的破骨细胞。Takahashi 等^[4]对大鼠的破骨细胞培养研究表明,1,25(OH)₂D₃ 的效应呈剂量依赖性,10⁻⁸ mol/L 的 1,25(OH)₂D₃ 具有最强的生物效应。同时指出,以往所用的破骨细胞培养体系亦证明培养中加入 VitD₃ 可明显促进破骨细胞的形成与分化。

绝经后骨质疏松又称为 1 型原发性骨质疏松症,其发生机制主要是由于绝经后雌激素分泌不足^[5],雌激素具有促进降钙素分泌和抑制破骨细胞刺激成骨细胞的作用,雌激素分泌不足,使破骨细胞过于活跃,骨转换增加,即骨形成与骨吸收均增加,骨吸收大于骨形成,骨生成跟不上骨吸收的速度,影响骨胶原的成熟和骨矿化。本实验观察到大鼠去势后,实验组破骨细胞数量较对照组增多,在术后 6 周达到高峰。OPG mRNA 基因表达同样也是这样,在术后 6 周表达较对照组明显增强。这些均进一步证实了雌激素水平降低可导致骨代谢异常。说明绝经后雌激素水平下降是导致骨质疏松的主要因素^[6]。

【 参 考 文 献 】

[1] 林远方,卿茂盛,李昂,等. 雌激素抗氧化作用与绝经后骨质疏松症的关系. 中国骨质疏松杂志, 2006,12(6):565-567.
[2] 夏文芳,陈璐璐,曾天舒. 改良的成年大鼠骨髓源性破骨细胞诱导培养体系. 华中科技大学学报(医学版), 2002,31(5):534-536.
[3] Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, et al. Cross-talk between the IL-6 and prostaglandin E₂ signalling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the OPG/RANKL/RANK system. Endocrinology, 2005,146(4):1991-1998.
[4] Takahashi N, Yoshikis. Osteoclastlike cell formation and its retetropic hormones in mouse bone marrow culture. Endocrinology, 1998,122,1373.
[5] 薛延. 骨质疏松症诊断与治疗指南. 科学出版社, 1999:34-41.
[6] 戴尅戎,沈霖. 血清基质金属蛋白酶 2 和抑制因子与绝经后骨质疏松症的相关性. 中国骨质疏松杂志, 2007,4(13): 229-232.

(收稿日期:2008-11-27)