

去势大鼠骨组织中 OPG、VEGF 在雌激素治疗前后的变化

李晋平 章明放 石少辉 张玉洁 赵凤云 李忠武 孙锐

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)08-0551-06

摘要:目的 制备去卵巢大鼠骨质疏松模型,比较去势 6、8 周后胫骨上 VEGF mRNA、OPG 的表达,及雌激素治疗后的变化。方法 53 只 6 月龄的 SD 雌性大鼠随机分成 3 组:ovx 组(去势组),sham 组(假手术组),ovx + E₂ 组(雌激素治疗组);分别在去势后 6 周末和 8 周末股动脉放血处死大鼠,每组各 8 只。取右侧胫骨脱钙后,行组织形态学观察及 VEGF 原位杂交和 OPG 免疫组化镜下观察。结果 去势 6 周和 8 周后,可见(1)OPG 蛋白表达情况:①OPG 阳性细胞主要表达在大鼠胫骨的关节软骨细胞、髌板肥大区软骨细胞,及髌板下初级骨小梁的黏合线上。成骨细胞和骨细胞呈弱阳性表达。骨髓腔间充质细胞表达弱或没有表达,巨核细胞可有弱阳性的表达;②与 sham 组相比,ovx 组中关节软骨细胞、髌板肥大区软骨细胞阳性表达有升高趋势;③与 ovx 组相比,ovx + E₂ 组关节软骨细胞、髌板肥大区软骨细胞阳性表达有升高趋势。(2)VEGF mRNA 表达情况:①VEGF mRNA 阳性细胞主要表达于关节软骨细胞、髌板肥大区细胞和增生区细胞、成骨细胞和骨细胞及骨髓间充质细胞和巨核细胞、皮质外侧的成纤维细胞;②与 sham 组相比,ovx 组髌板肥大区软骨细胞、关节软骨细胞、骨髓间充质细胞阳性表达有升高趋势;③与 ovx 组相比,ovx + E₂ 组关节软骨、髌板肥大区软骨细胞阳性信号有降低趋势,骨髓间充质细胞的阳性信号有升高趋势。结论 (1)去势后雌激素降低,骨重建加强,骨吸收和骨形成均增加,OPG 一过性升高可调节破骨细胞的募集和形成。雌激素治疗后 OPG 表达增高提示 OPG 可能具有一定的雌激素依赖性。(2)去势后雌激素降低,VEGF 生成增多,并参与到骨的血管形成过程中,参与骨丢失。VEGF 可能作为破骨细胞的诱导物,促使破骨细胞形成。给予雌激素治疗后,雌激素可使 VEGF 参与血管形成过程,调节成骨细胞的骨形成过程。

关键词: OPG; VEGF; 骨质疏松; 去势; 成骨细胞; 破骨细胞; 髌板; 软骨细胞

doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.08.001

The expression of OPG, VEGF in the bones of ovariectomized rats before and after estrogen treatment LI Jinping, ZHANG Mingfang, SHI Shaohui, et al. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: **Objective** To observe the local expressions of VEGF mRNA and OPG in tibias of 6 weeks, 8 weeks after ovariectomized rats, and OPG, VEGF mRNA changes after E₂ treatment. **Methods** Fifty-three female SD rats, six months, were randomly divided into 3 groups: ovx (ovariectomized) group, sham group and estrogen treatment. Every group had 8 rats. All rats were sacrificed by arteria cruralis bleeding at the end of 6 w and 8 w after ovx. We selected right tibias to observe histology, in situ hybridization of VEGF mRNA and immunohistochemistry of OPG and counted. **Results** 6 w and 8 w after ovx, we can see (1) OPG protein expression expressions: ① OPG protein expressions are mainly situated in cartilage cells, hypertrophic chondrocytes of epiphyseal plate, and cement line of primary bone trabecula. Osteoblasts and osteocytes are weakly positive. Mesenchymal cells in bone marrow expressed very weak or no. And megakaryocytes are weakly positive; ② In ovx groups, OPG protein expressions in cartilage cells, hypertrophic chondrocytes of epiphyseal plate have a more tendency than those of sham groups; ③ In ovx + E₂ groups, OPG protein expressions in above locations

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目(003606711)

作者单位: 300070 天津 天津医科大学病理学教研室

通讯作者: 章明放, Email: ykzhangmingfang@hotmail.com

have a more tendency than those of ovx groups (2) VEGF mRNA expressions status (1) VEGF mRNA expressions are mostly situated in cartilar cartilage cells, hypertrophic chondrocytes and proliferative chondrocytes of epiphyseal plate, osteoblasts, osteocytes, and mesenchymal cells in bone marrow, especially megakaryocytes, and fibroblasts besides cortical substances; (2) In ovx groups VEGF mRNA expressions in cartilar cartilage cells, hypertrophic chondrocytes of epiphyseal plate and mesenchymal cells in bone marrow have a more tendency than those of sham groups; (3) In ovx + E₂ groups VEGF mRNA expressions in cartilar cartilage cells, hypertrophic chondrocytes of epiphyseal plate have a less tendency than those of ovx groups. **Conclusion** (1) After ovx, estrogen defect, which makes both bone remodeling strong and bone resorption and formation enhancing, may result in an increasing moment expression of OPG to accommodate osteoclast recruitment and formation; After estrogen treatment, the increasing expression of OPG may indicate OPG has partly an estrogen-dependency. (2) Estrogen defect after ovx may produce more VEGF to participate in bone angiopoietic process. And perhaps more angiopoiesis formate to participate in bone loss. Moreover, VEGF as osteoclastic chemotaxin may induce osteoclast bone resorption. After estrogen treatment, estrogen stimulate VEGF to participate in bone angiopoietic process so as to regulate bone formation by osteoblast.

Key words: Osteoporosis; Vascular endothelial growth factor; Osteoporosis; Ovariectomized; Osteoblast; Osteoclast; Epiphyseal plate; Chondrocyte

骨质疏松症(Osteoporosis),尤其是绝经后骨质疏松症(PMOP)对老年人群健康的影响日益受到世人的重视。绝经后骨质疏松症为多因素引起的代谢性骨病,雌激素缺乏是主要原因。但至今对骨质疏松的详细发病机制仍未能阐明,对于该病的防治仍未解决。

本实验旨在建立骨质疏松模型,观察去势大鼠中不同时期胫骨 OPG、VEGF mRNA 原位表达,来探讨它们在去势后骨质疏松发病中的作用,以及雌激素治疗后的变化,为临床防治骨质疏松提供借鉴和参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6 月龄 SD 大鼠 53 只(购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心)。湿度 30%~40%,温度 21~23℃。人工照明(明 12 h/暗 12 h)。标准固体饲料及饮水(天津市自来水)。大鼠随机分为:sham 组(假手术组)、ovx 组(去势组)和 ovx + E₂ 组(雌激素治疗组)。手术前以 10% 水合氯醛 3 ml/kg 体重腹腔注射麻醉。① sham 组(假手术组):背部切口,保留双侧卵巢,只切除少许脂肪组织。② ovx 组(去势组):背部切口切除双侧卵巢。③ ovx + E₂ 组(雌激素治疗组):行卵巢切除术,术后第 2 天开始给予苯甲酸雌二醇皮下注射 20 μg/kg 体重每次 3 天 1 次(苯甲酸雌二醇购自天津金耀氨基酸有限公司)。实验分别于术后 6 周末和 8 周末行股动脉放血处死。

1.2 实验方法

1.2.1 取材与处理 大鼠处死后即刻取右侧胫骨固定于 4% 多聚甲醛液(含 1% DEPC),固定 24 h 后入 15% EDTA(乙二胺四乙酸)中性福尔马林液中脱钙处理 17 天,用含 1% DEPC 的 PBS 漂洗 5 h。最后进行脱水、透明、浸蜡、包埋。切成 5 μm 厚纵向骨切片。

1.2.2 原位杂交 cDNA 探针原位杂交试剂盒由武汉博士德生物技术有限公司提供。步骤如试剂说明书。

1.2.3 免疫组化 采用 SP 法。山羊抗 OPG 多克隆抗体(sc-8486)由北京中杉生物技术有限公司提供。

1.3 统计学处理

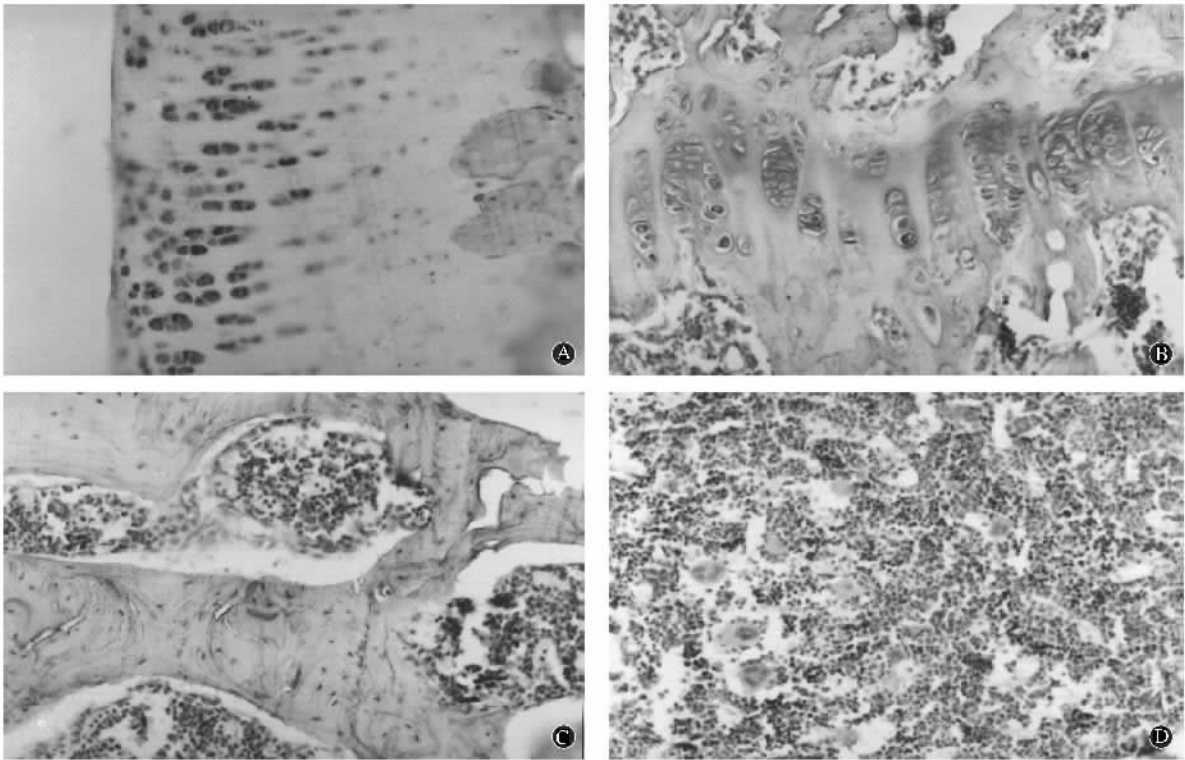
每张切片在光学显微镜高倍视野下网格计数,任取 5 个视野,记取总阳性细胞数,求取平均每个高倍视野的阳性细胞数。

所有数据均用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析即各组数据之间的两两比较的 LSD-*t* 检验和两样本的 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有显著性。

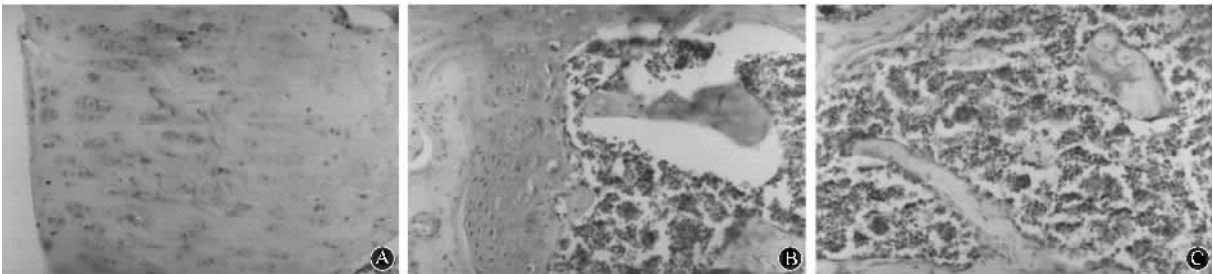
2 结果

2.1 OPG 免疫组化表达结果(图 1)

2.1.1 组织学 OPG 阳性细胞为胞浆呈棕黄色,复染后核呈蓝色。OPG 阳性细胞主要出现在大鼠胫骨的关节软骨细胞,骺板肥大区软骨细胞及骨小梁的黏合线处。骨细胞和成骨细胞表达呈弱阳性。骨髓腔间充质细胞表达弱阳性甚至无表达;巨核细胞弱阳性表达。除此外,骨皮质的外膜处成纤维细胞部



A 关节软骨细胞 ;B 骺板肥大区软骨细胞 ;C 骨小梁黏合线 ;D 骨髓腔巨核细胞
图 1 OPG 免疫组化表达结果(× 200)



A 关节软骨细胞 ;B 骺板肥大区软骨细胞 ;C 骨髓腔中的巨核细胞
图 2 VEGF mRNA 原位杂交表达(× 200)

分呈阳性表达。

2.1.2 OPG 免疫组化表达情况(表 1)

2.2 VEGF mRNA 原位杂交表达结果(图 2)

VEGF mRNA 阳性细胞为棕黄色 ,定位在胞浆 ,复染后 核呈蓝色。VEGF mRNA 阳性细胞主要表达于 ①关节软骨细胞。②骺板肥大区细胞和增生区细胞 ,尤其在肥大区与增生区交接处的肥大细胞尤为突出 ,呈较强阳性表达 ,增生区软骨细胞呈弱阳性表达。③VEGF mRNA 阳性细胞还表达于成骨细胞和骨细胞 ,尤其在小梁骨周围的成骨细胞 ,皮质内侧的成骨细胞均有阳性表达。④VEGF mRNA 阳性细

胞还表达于皮质外侧的成纤维细胞。⑤ VEGF mRNA 阳性细胞还表达于骨髓间充质细胞 ,尤其巨核细胞也有弱阳性表达 ,在骨髓腔中较突出。

表 1 OPG 阳性细胞表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	关节软骨细胞(个/HP)		骺板肥大区软骨细胞(个/HP)	
	6 周	8 周	6 周	8 周
sham	27.90 ± 12.94	31.43 ± 8.31	11.97 ± 5.26	10.83 ± 4.82
ovx	33.17 ± 16.72	43.80 ± 17.57	12.30 ± 7.52	15.73 ± 4.26
ovx + E ₂	40.77 ± 7.37	37.60 ± 12.69	13.20 ± 4.31	18.23 ± 6.20 [△]

注 :n = 6 例。与 sham 组比较 :[△] P < 0.05

从切片可看出 :①关节软骨细胞、骺板软骨细胞

VEGF mRNA 阳性表达在 ovx 组中有比 sham 组升高趋势。②与 ovx 组相比,ovx + E₂ 组的关节软骨细胞、骺板软骨细胞 VEGF mRNA 阳性表达仍有升高趋势。③骨髓腔中的间充质细胞在 ovx 组中,VEGF mRNA 阳性表达比 sham 组有所增加,而在 ovx + E₂ 组中仍表现出增加的趋势。

3 讨论

3.1 OPG 免疫组化表达及分析

OPG 即骨保护素,是 TNF 受体超家族成员。它是一种分泌型糖蛋白,是调节 ODF/RANKL 的诱导受体,与 ODF 竞争同 RANK 的结合,来调节破骨细胞分化。现在认为在调节骨代谢中起着重要的作用。

迄今,在去势大鼠胫骨上做 OPG 免疫组化的报道较少,且在成年大鼠体内的表达研究就更具价值。

3.1.1 关节软骨:从本研究可以看到各组均有关节软骨细胞的 OPG 表达。ovx 组 OPG 的表达较 sham 组有升高趋势,这与 Tohrui 等^[1]在 2001 年的报道一致。ovx + E₂ 组关节软骨的 OPG 阳性细胞数较 ovx 组或 sham 组也都有上升趋势。

据此,去势后大鼠胫骨 OPG 的表达出现上升的趋势,可能与雌激素刺激 OPG 产生的通常观点有所不同,其机制可能是由于雌激素突然降低,使得骨重建加强,骨吸收和骨形成增加,OPG 一过性升高来调节破骨细胞的募集和形成。

在 ovx + E₂ 组中 OPG 的表达都较其他两组升高,考虑雌激素的应用对 OPG 的产生起到了一定的刺激作用,同时也存在去势后 OPG 反应性增多的因素。从而产生 ovx + E₂ 组 OPG 在关节软骨细胞中的表达升高的可能。

3.1.2 骺板软骨:骺板处软骨细胞的表达主要集中在肥大区,增生区表达很弱。肥大区 OPG 阳性细胞的表达结果同关节软骨表达类似,去势后 OPG 表达较 sham 组有上升趋势,原因可能是去势后,骺板肥大区软骨细胞一过性分泌 OPG 升高,调节骺板软骨的重建活动。给予雌激素处理后,OPG 表达较 ovx 组有升高趋势,可能与骺板肥大区软骨细胞为雌激素依赖性有关,通过雌激素受体介导机制调节 OPG 分泌。

3.1.3 成骨细胞和骨细胞:由本研究可见,成骨细胞和骨细胞的 OPG 表达非常弱,且数量较少。此观察结果与 Hiroaki 等^[2]报道的 OPG 免疫组化结果一

致。成骨细胞通过 RANKL 和 OPG 的增加或减少来自调节破骨细胞形成过程^[3]。

3.1.4 黏合线处:在骺板下初级小梁骨处有多处黏合线呈 OPG 阳性表达,这可能由于黏合线处有 osteopontin(骨桥蛋白)和骨涎蛋白,参与 OPG 的定位。因此 OPG 结合骨基质蛋白定位于黏合线上^[2]。在功能上,破骨细胞先在该处进行骨基质的吸收,之后 OPG 由成骨细胞系的细胞分泌/或者来源于血清,出现在破骨细胞吸收处,来抵抗破骨细胞进一步的骨吸收活动^[2]。这在骨重建过程中有着重要的意义。

3.1.5 巨核细胞:骨髓中巨核细胞 OPG 呈阳性表达,ovx 组与 sham 组相比,巨核细胞阳性数有增加趋势,雌激素治疗后巨核细胞阳性细胞数较 ovx 组有升高趋势,可能与巨核细胞通过 ER 受体介导机制参与到骨代谢中有关。

骨髓中的造血细胞紧密地参与骨的调节平衡^[4]。研究显示,雌激素可以引起巨核细胞的形成,并且诱导人巨核细胞内的蛋白和 mRNA 水平变化。雌激素上调 OPG 和下调 RANKL 参与骨重建。说明巨核细胞在雌激素引起的骨骼效应中,尤其在雌激素引起破骨细胞的形成和骨吸收中,发挥了重要作用^[5]。

综上所述,去势后的骨质疏松由于雌激素的缺乏导致促骨吸收因子,如 IL-1、TNF- α 、IL-6 和 M-CSF 等表达增加^[6]和/或细胞因子如 TGF- β 的直接或者间接作用^[3],来下调下游的 OPG。从而通过减弱 OPG 竞争 RANKL-RANK 的结合,促进破骨细胞的生成和分化。最终导致骨质疏松的发生。或者,雌激素的缺乏直接引起 OPG 的上调,然后 OPG 作为上游因子直接刺激经 ER α 转录活化的成骨细胞/基质细胞表达 OPG。雌激素缺乏最终导致 OPG 量下调和骨生物学效应下降,及 OPGL 的生物学作用增加,使得破骨细胞池扩大和骨吸收增强^[7]。所以,OPG 在骨中的异常表达是绝经后骨质疏松症的发生机制之一。

3.2 VEGF mRNA 原位杂交情况及分析

血管形成在骨代谢中起着重要的作用,近来也发现 VEGF 在破骨细胞形成方面也有不可替代的作用,因此对于 VEGF 在骨中表达的研究对于探讨骨质疏松的发生有着重要的意义。

(1)关节软骨细胞、骺板软骨细胞 VEGF mRNA 阳性表达在 ovx 组中有比 sham 组升高趋势。可能因去势大鼠雌激素水平降低,破骨活动和成骨活动

增强,尤其破骨活动促使成骨细胞分泌一些细胞因子,如 TGF β 1、OPG,此外,也分泌 VEGF,参与骨的血管形成过程,引起雌激素缺乏后的血管改变,参与到骨丢失机制中^[8]。另外 VEGF 也能激活成软骨破骨细胞^[9]。

(2)与 ovx 组相比,ovx + E₂ 组的关节软骨细胞、髌板软骨细胞 VEGF mRNA 阳性表达仍表达升高。这可能是补充雌激素之后,除了弥补了 VEGF 生成增多而引起活跃的破骨活动外,还促使过多的 VEGF 参与血管形成,调节成骨细胞的骨形成过程。

(3)骨髓腔中的细胞在 ovx 组中,VEGF mRNA 阳性表达较 sham 组有所增加,而且在 ovx + E₂ 组中仍表现出增加趋势。原因可能跟骨髓腔中的细胞成分多样有关。骨髓腔中除了有基质细胞、成骨细胞前体、破骨细胞前体、单核巨噬细胞、成骨细胞、破骨细胞外,还有脂肪细胞、肌源性细胞等,因此骨髓腔中的 VEGF 由多种细胞产生外,VEGF 变化也受到多种细胞的不同影响。VEGF 的产生与间充质细胞的分化密切相关^[10]。

综上所述,在去势后骨质疏松症中,由于雌激素缺乏,使得骨重建增强,破骨活动和成骨活动增强。VEGF 由成骨细胞系的细胞分泌,作用于不同靶细胞发挥不同的作用。一方面,参与骨的血管形成的过程,引起的血管形态改变^[8],提供了各型细胞募集所需管道系统,参与到骨丢失的机制中。有文献报道,VEGF164 和/或 VEGF188 在正常软骨内成骨发育过程中起到重要作用,它不仅调节血管形成,而且使肥大软骨细胞、成骨细胞、内皮细胞和破骨细胞分化^[11]。另一方面,VEGF 作为破骨细胞的诱导物,促使破骨细胞的形成^[12],参与激活骨吸收活动。从而最终引起骨质疏松的发生。因此,VEGF 的异常表达是绝经后骨质疏松发生的机制之一。

3.3 OPG 和 VEGF 在骨中的表达结果对于临床的指导意义

OPG 和 VEGF 在骨吸收、骨形成及骨髓为环境中细胞之间相互作用的机制中发挥一定的作用,调节骨转化过程。

综上结果分析,OPG 在给予雌激素治疗后各部位的表达均升高,提示雌激素可以促进 OPG 的表达^[13],从而抑制骨吸收,为临床运用雌激素治疗骨质疏松提供了指导依据。另外有文献报道,将重组 OPG 注入到去势大鼠中,可见骨量的增加,破骨细胞数的减少提示 OPG 可以用来预防或减少雌激素减少引起的骨丢失^[14]。OPG 在破骨细胞产生、分化方

面发挥着重要的作用,是调节骨转化方面不可缺少的耦联因子。因此,OPG 在骨质疏松的预防和治疗方面开创了一条新途径。

本试验还表明,VEGF 在去势后的减少和雌激素治疗后的增加,说明通过去势减少 VEGF 表达,激活破骨细胞形成参与骨丢失活动^[12],而给予雌激素治疗后,VEGF 表达增加,不仅激活破骨细胞而且也可调节成骨细胞活性^[15],从而调节骨转化过程,最终达到骨重建,对于临床运用雌激素治疗骨质疏松提供了一定的指导依据。

【参考文献】

- [1] Tohru Ikeda, Masanori Utsuyama, Katsui Hirokawa. Expression profiles of receptor activator of Nuclear Factor- κ B Ligand, Receptor Activator of Nuclear Factor κ B, and Osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones. *J Bone Miner Res*, 2001, 16 (8): 1416-1425.
- [2] Hiroaki Nakamura, Takehito Tsuji, Azumi Hirata, et al. Localization of osteoprotegerin (OPG) on bone surfaces and cement lines in rat tibia. *The journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2002, 50 (7): 945-953.
- [3] Julian MW, Quinn Kanami Itoh, Nobuyuki Udagawa, et al. Transforming Growth Factor- β Affects Osteoclast Differentiation via Direct and Indirect Actions. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 1787-1794.
- [4] Compston JE. Bone marrow and bone: a functional unit. *Journal of Endocrinology*, 2002, 173: 387-394.
- [5] Bord S, Frith E, Ireland DE, et al. Synthesis of osteoprotegerin and RANKL by megakaryocytes is modulated by oestrogen. *British Journal of Haematology*, 2004, 126: 244-251.
- [6] Su X, Liao EY, Peng J, et al. The effects of 17 beta-estradiol on the expression of osteoprotegerin, the ligand of osteoprotegerin and related cytokines in osteosarcoma MG63 cells. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2003, 48 (11): 800-803.
- [7] Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*, 2000, 15: 2-12.
- [8] Mekraldi S, Lafage-Proust MH, Bloomfield S, et al. Changes in vasoactive factors associated with altered vessel morphology in the tibial metaphysis during ovariectomy-induced bone loss in rats. *Bone*, 2003, 32 (6): 630-641.
- [9] Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*, 1999, 5: 623-628.
- [10] Haradas, Nagya, Sullivan, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E₂ and E₁ in osteoblasts. *Journal of Clinical Investigation*, 1994, 93: 2490-2496.
- [11] Maes C, Carmeliet P, Moermans K, et al. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mech Dev*, 2002,

111(1-2) 61-73.

- [12] Ichiro kodama , Shumpei niida , Mitsuhiro sanada , et al. Estrogen regulates the production of VEGF for osteoclast formation and activity in op/op mice. Journal of Bone and Mineral Research 2004 2 :200.
- [13] Hofbauer LC ,Khosla S ,Dunstan CR , et al. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. Endocrinology ,1999 ,140 :4367-4370.
- [14] Mark C. Horowitz ,Yongen Xi , Kimberly Wilson ,et al. Control of

osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. Cytokine and Growth Factor Reviews ,2001 , 12 9-18.

- [15] Elazar Zelzer , William Mclean , Yin-shan Ng , et al. Skeletal defects in VEGF120/120 mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. Development ,2002 ,129 :1893-1904.

(收稿日期 :2007-11-01)