

## • 基础研究 •

## 雌激素对血清饥饿诱导成骨细胞凋亡的影响

唐孝明,裴福兴,沈彬,刘仲前,张耀明,庞健

[摘要] 目的 探讨雌激素对血清饥饿诱导体外培养大鼠成骨细胞凋亡的影响。方法 新生 SD 大鼠颅骨第 2、3 代成骨细胞随机分为对照组、血清饥饿组和血清饥饿 + 雌激素组,每组细胞分别培养 24 h、48 h、72 h、5 d、7 d、14 d 后行 TUNEL 染色观察凋亡细胞的形态特征;流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。结果 对照组细胞核未见明显异常;血清饥饿组可见细胞核内有紫蓝色颗粒的凋亡细胞;血清饥饿 + 雌激素组凋亡细胞明显减少;与对照组比较,血清饥饿组细胞凋亡率升高,血清饥饿 + 雌激素组细胞凋亡率降低 ( $P < 0.05$ )。结论 雌激素能抑制血清饥饿诱导的大鼠成骨细胞凋亡。

[关键词] 雌激素;成骨细胞;细胞凋亡;血清饥饿

Effect of Estrogen on Osteoblast Apoptosis Induced by Serum Hungry TANG Xiao-ming, PEI Fu-xing, SHEN Bin, et al. The Department of Orthopaedics, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan, China

[Abstract] Objective To explore the effect of estrogen on osteoblast apoptosis induced by serum hungry in vitro. Methods Osteoblasts of second or third generation from newly born SD rats calvaria were divided randomly into the control group, serum hungry group and serum hungry with estrogen group. Cells of each group were incubated for 24 h, 48 h, 72 h, 5 d, 7 d and 14 d, then labeled using TUNEL staining and examined for morphological characteristics of apoptotic cell under light microscopy after incubated for 72 h. The rates of apoptotic cells of each group were examined with flow cytometry. Results The cells of the control group showed normal appears, the serum hungry group had many cells with purple and blue particles in nuclei, but serum hungry with estrogen group had less such cells. The rate of apoptotic cell significantly increased in serum hungry group and decreased in serum hungry with estrogen group compared with the control group examined with flow cytometry ( $P < 0.05$ ). Conclusion Estrogen can repress osteoblasts apoptosis of rats induced by serum hungry.

[Key words] estrogen; osteoblast; apoptosis; serum hungry

中图分类号: R329.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2006)02-0123-03

[本文著录格式] 唐孝明,裴福兴,沈彬,等. 雌激素对血清饥饿诱导成骨细胞凋亡的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(2): 123-125.

成骨细胞凋亡在骨的转换中起重要的作用。Jilka 等认为,成骨细胞在完成骨形成功能以后,一部分被包于骨基质中,另一部分成为骨细胞或衬细胞位于骨表面,50%~70%的成骨细胞以凋亡的形式死亡<sup>[1]</sup>。部分治疗骨质疏松的药物如 Vit K<sub>2</sub>、羟乙二磷酸盐(Etidronate)均能抑制成骨细胞的凋亡从而治疗骨质疏松<sup>[2]</sup>。雌激素是一种能直接作用于成骨细胞的药物,但有关该药对成骨细胞凋亡作用的报道少见。

本实验以体外培养的大鼠颅骨成骨细胞为研究对象,旨在研究雌激素对血清饥饿诱导的成骨细胞凋亡的影响,为探讨雌激素治疗骨质疏松的机理提供理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 成骨细胞的培养和鉴定 新生(出生 3~5 d)SD 大鼠消毒后处死,无菌取颅骨,置于含有 DMEM 的培养皿中,剔除骨内、外膜及骨缝间组织, Hank's 液反复

浸泡、洗涤 3 次,将骨块修整为 1~2 mm<sup>2</sup> 大小碎块,0.25%胰蛋白酶 37℃消化 20 min。终止消化后,用弯吸管吸取碎骨片,均匀接种于 25 ml 培养瓶中,翻转培养瓶置 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 孵箱中 2~3 h,转正培养瓶并加入含有 20%小牛血清的 DMEM 培养液后继续培养。3 d 后换液,7~10 d 后待细胞融合成单层再传代培养。从形态和碱性磷酸酶染色对成骨细胞进行鉴定。

1.2 细胞分组 第 2、3 代细胞用 0.25%胰蛋白酶消化,DMEM 培养液漂洗 2 遍,然后配成  $1 \times 10^5$  / ml 浓度的细胞悬液。将细胞悬液加到 6 孔板上,每孔 1 ml,加入 1 ml 含 20%小牛血清的 DMEM 液后放入 37℃ 培养箱中培养。待细胞长满后加入 1 ml 以下溶液:①对照组(A组):加入含 20%小牛血清的 DMEM 液;②血清饥饿组(B组):移出血清,加入不含血清的等量 DMEM 液;③血清饥饿 + 雌激素组(C组):移出血清,加入不含血清的 DMEM 液,并加入雌激素 17 $\beta$ E<sub>2</sub> (浓度为 1.0 nm)。

各组细胞在 37℃ 培养箱中分别培养 24 h、48 h、72 h、5 d、7 d 和 14 d 后进行凋亡指标检测。

1.3 凋亡细胞 TUNEL 染色 取生长旺盛的第 2、3

作者单位:四川省人民医院骨科,四川成都市 610072。作者简介:唐孝明(1968-),男,四川广汉市人,副主任医师,博士,主要研究方向:脊柱与关节外科。

代成骨细胞配成  $1 \times 10^5 / \text{ml}$  的细胞悬液,加入预置  $15 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$  血盖片的 6 孔板上,每孔  $1 \text{ ml}$ ,待细胞长满后加入药液。细胞按前述方法分组,培养  $14 \text{ d}$  后取出干燥,用  $4\%$  多聚甲醛 PBS 液浸泡固定  $30 \text{ min}$ , $0.1\%$  Triton X-100(柠檬酸 Triton X-100 渗透液)渗透液浸泡切片  $2 \sim 5 \text{ min}$ ,滴加 TUNEL 反应混合液, $37^\circ\text{C}$   $1 \text{ h}$ ,滴加 converter-AP(抗 FITC-AP),用 NBT/BCIP 显色(显色用底物缓冲液按  $1:50$  配制),核固红复染,干燥,封片。显微镜下观察细胞核内有无紫兰色颗粒,有为阳性细胞。

1.4 流式细胞学检查 各组细胞培养  $24 \text{ h}$ 、 $48 \text{ h}$ 、 $72 \text{ h}$ 、 $5 \text{ d}$ 、 $7 \text{ d}$ 、 $14 \text{ d}$  后,细胞悬液移入离心管离心;加入  $1 \text{ ml}$   $0.1 \text{ M}$  PBS 液重悬,再离心;加入  $75\%$  酒精(细胞密度  $1 \times 10^6 / \text{ml}$ )重悬, $4^\circ\text{C}$  固定  $24 \text{ h}$  后用流式细胞仪检测。

1.5 统计学处理 各组细胞凋亡率以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,应用 SPSS 10.0 统计软件包进行  $\chi^2$  检验。

2 结果

2.1 成骨细胞显微结构观察 培养第 3 天,相差显微镜下可见成骨细胞自颅骨碎片移出,呈短梭形或三角形,生长于瓶底;培养第 7~8 天,细胞融合成单层。传代细胞在  $6 \text{ h}$  内贴壁,细胞形态为长梭形、鳞片形、短梭形、圆形,细胞周围有半透明光晕,核椭圆居中,轮廓清晰,核内有  $1 \sim 2$  个核仁,细胞突起细长,常跨越细胞与远处的细胞突起相连接。

2.2 碱性磷酸酶染色 原代细胞阳性率为  $78.6\%$ ,染成紫色的阳性细胞多为梭形和鳞片形细胞。随着传代次数的增多,阳性细胞率随之增加,第 3 代为  $92.1\%$ 。

2.3 TUNEL 染色 对照组细胞形态正常(见封三图 1.1),血清饥饿组可见细胞核内有较多紫兰色颗粒的阳性细胞(见封三图 1.2),血清饥饿 + 雌激素组该类细胞明显减少(见封三图 1.3)。

2.4 流式细胞仪检测 对照组(A组)细胞的凋亡率均  $<5\%$ ;血清饥饿组(B组)各时段凋亡率均高于对照组( $P < 0.05$ ),高峰出现于  $14 \text{ d}$ ;血清饥饿 + 雌激素组(C组)各时段凋亡率降低( $P < 0.05$ ),高峰仍为  $14 \text{ d}$ 。各组凋亡率见表 1。

表 1 各组细胞凋亡率  $(\bar{x} \pm s)$

分组	24 h	48 h	72 h	5 d	7 d	14 d
A 组	$1.9 \pm 0.03$	$2.4 \pm 0.06$	$1.9 \pm 0.02$	$2.7 \pm 0.01$	$2.3 \pm 0.02$	$4.9 \pm 0.01$
B 组	$7.1 \pm 0.02$	$14.6 \pm 0.75$	$20.8 \pm 3.30$	$27.6 \pm 3.35$	$35.6 \pm 4.47$	$46.6 \pm 6.32$
C 组	$4.9 \pm 0.01$	$6.5 \pm 0.04$	$10.6 \pm 0.23$	$18.7 \pm 3.16$	$19.0 \pm 4.28$	$28.3 \pm 5.36$
Pa	$<0.01$	$<0.01$	$<0.01$	$<0.01$	$<0.01$	$<0.01$
Pb	$<0.05$	$<0.05$	$<0.05$	$<0.05$	$<0.05$	$<0.05$

注:a.A 组与 B 组比较;b.B 组与 C 组比较。

3 讨论

雌激素对骨代谢有显著影响,雌激素缺乏可导致骨转换加快、骨质疏松<sup>[3]</sup>。虽然雌激素替代治疗能防

治绝经后骨质疏松并能减少骨质疏松性骨折<sup>[4]</sup>,但其机理并不明确。传统的观点认为,雌激素替代治疗骨质疏松的机理为抑制破骨细胞的破骨吸收功能和骨转换速度,从而减少骨量丢失<sup>[5,6]</sup>。自从成骨细胞表面受体被发现以后<sup>[7]</sup>,雌激素对成骨细胞的直接作用逐渐受到重视。对大鼠成骨样细胞系列 MC3 T3-E1 细胞,雌激素能增加其 DNA 含量和碱性磷酸酶活性<sup>[8]</sup>。绝经后骨质疏松患者的骨吸收和骨形成均增加,但骨形成增加的幅度远低于骨吸收的增幅。Garnod 等的研究表明,绝经后骨质疏松妇女的骨吸收增加  $>90\%$ ,而骨形成仅增加  $45\%$ <sup>[9]</sup>。Malluche 等发现,子宫卵巢全切的 Beagle 狗 4 个月后髂骨峭活检显示,松质骨和小梁骨平均厚度明显变小,而且成骨细胞的数量和骨形成率均明显降低,但反映骨吸收的形态学指标并无明显变化<sup>[10]</sup>。可见,骨形成不足在雌激素缺乏导致的骨质疏松发生中起着不可忽视的作用。

成骨细胞的数量和存活状态直接决定骨形成的多少。近年来的研究显示,成骨细胞凋亡在骨质疏松的发生中起重要作用。Weinstein 等对 7 月龄大鼠用泼尼松龙注射,27 d 后发现骨转换率、骨密度和血清骨钙素水平降低,出现骨小梁稀疏等骨质疏松的表现,检测发现椎体成骨细胞较正常升高 3 倍,干骺端皮质骨有  $28\%$  的骨细胞发生凋亡<sup>[11]</sup>。Silvestrini 等对大鼠注射肾上腺酮( $10 \text{ mg/d}$ )诱导骨质疏松,然后对成骨细胞、破骨细胞的凋亡和形态学计量指标进行相关性研究,发现成骨细胞凋亡率显著增加,相应的骨形成计量学指标降低,而破骨细胞的凋亡轻度增加,相关破骨计量学指标无变化,终末端肥大软骨板厚度变小<sup>[12]</sup>,表明糖皮质激素通过促使成骨细胞及骨细胞凋亡使构成骨组织的细胞减少,大量的骨细胞凋亡导致骨皮质松脆、压力应力减弱,从而导致患者发生骨质疏松。

为探讨雌激素对成骨细胞凋亡的影响,本研究以体外培养的新生大鼠颅骨成骨细胞为研究对象,结果发现体外正常培养的成骨细胞凋亡率很低( $<5\%$ )。文献报道,体外培养的成骨细胞只有在接种密度过低( $<5 \times 10^3 / \text{ml}$ ),细胞间失去相互作用的信号时才会发生大量凋亡<sup>[13]</sup>,本研究结果与其一致。在血清饥饿组,我们采取吸出含  $10\%$  小牛血清的 DMEM 液,加入等量不含血清 DME M 培养液的方法,结果发现移出血清后  $24 \text{ h}$  即出现成骨细胞凋亡,而且随着时间的延长,凋亡细胞逐渐增多, $14 \text{ d}$  凋亡达到高峰,而加入雌激素后(血清饥饿 + 雌激素组)可以明显抑制血清饥饿所致的细胞凋亡(各时段凋亡率均低于血清饥饿组),但凋亡高峰仍为  $14 \text{ d}$ 。本研究结果与 Gohe<sup>[14]</sup>的研究结果不一致,Gohe 的研究显示雌激素能抑制氢化可的松诱导的大鼠成骨细胞凋亡,但高峰期出现在  $72 \text{ h}$ 。两

实验出现差异的原因可能是本实验血清饥饿组成骨细胞在无血清的培养基内生长,不含血清的 D MEM 培养液已含有细胞生存所需的基本营养物质,故细胞对血清饥饿的耐受性相对较强,细胞凋亡高峰期出现较晚。虽然雌激素能抑制血清饥饿诱导的成骨细胞凋亡,但对高峰期出现的时间并无影响,表明雌激素对血清饥饿诱导的成骨细胞凋亡的趋势无明显影响。

雌激素抑制成骨细胞凋亡在雌激素替代治疗中有重要意义。凋亡成骨细胞减少意味着有活性的成骨细胞增多,可有更多的成骨细胞填充到破骨细胞所形成的骨吸收陷窝,从而可抑制破骨细胞的骨吸收活性<sup>[3]</sup>;同时,有活性的成骨细胞增多可为雌激素提供更多的靶细胞;而雌激素能增加成骨细胞的碱性磷酸酶活性和 DNA 含量,还可增加成骨细胞 I 型胶原的表达<sup>[8]</sup>。通过上述作用,雌激素可增加骨的形成。另外,雌激素还可抑制成骨细胞腺苷酸环化酶的活化,而该酶的活化是甲状旁腺激素、前列腺素 E<sub>2</sub> 等骨吸收刺激激素激活破骨细胞吸收功能的必需环节<sup>[15]</sup>。因此,雌激素通过对成骨细胞凋亡的抑制不仅使骨形成增加,还使骨吸收减少,从而使净骨量增加,故可治疗骨质疏松。

#### [参考文献]

- [1] Jilka RL, Weistein RS, Bellido T, et al. Osteoblast programmed cell death: modulation by growth factor and cytokines[ J ]. J Bone Min Res 1998,13(5):793—802.
- [2] Abe Y, Kawakami A, Nakashima T, et al. Etidronate inhibits human osteoblast apoptosis by inhibition of proapoptotic factors produced by activated T cells[ J ]. J Lab Clin Med,2000,136:344—354.
- [3] Lindsay R, Hart DM, Aitken JM, et al. Long-term prevention of post menopausal osteoporosis by estrogen; Evidence for an increased bone mass after delayed onset of estrogen treatment[ J ]. Lancet,1986,1:1038—1041.
- [4] Ettinger B, Genant HK, Cann CE. Long-term estrogen replacement therapy prevents bone loss and fractures[ J ]. Ann Int Med,1985,102:319—324.
- [5] Kameda T, Mano H, Yuasa T, et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of bone resorbing osteoclast[ J ]. J Exp Med,1997,186:189—495.
- [6] 李爽,刘海全,罗毅文,等.运动对去卵巢大鼠骨组织形态计量学的影响[ J ].中国康复理论与实践,2005,11(4):245—246.
- [7] Komm BS. Estrogen binding receptor mRNA and biological response in osteosarcoma cell[ J ]. Science,1998,241:81—84.
- [8] Robert J, Ryaby JT, Einhorn TA. Direct modulation of osteoblastic activity with estrogen[ J ]. J Bone Joint Surg, 1994,76A:713—721.
- [9] Garnod P, Sornay RE, Chapuy M. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis[ J ]. J Bone Min Res,1996,11:337—349.
- [10] Malluche HH, Faugere MC, Rush M, et al. Osteoblastic insufficiency is responsible for maintenance of osteopenia after loss of ovarian function in experimental Beagle dogs[ J ]. Endocrinology,1986,119:2649—2654.
- [11] Weinstein RS, Jilka RL, Parifitt AM, et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids: potential mechanism of their deleterious effects on bone[ J ]. J Clin Invest,1998, 102:274—282.
- [12] Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli FR, et al. Evaluation of apoptosis and the glucocorticoid receptor in the cartilage growth plate and metaphyseal bone cells of rats after high dose treatment with corticosterone[ J ]. Bone,2000,26:33—42.
- [13] Tumber A, Meikle MC, Hill PA. Autocrine signals promote osteoblast survival in culture[ J ]. J Endocrinology, 2000,167:383—390.
- [14] Gohel A, McCarthy MB, Gronowiz G. Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis osteoblast in vivo and in vitro[ J ]. Endocrinology,1999,140:5339—5347.
- [15] Akatsu T, Takahashi N, Debari K, et al. Prostaglandins promote osteoblast like cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in mouse bone marrow cell cultures[ J ]. J Bone Min Res,1999,4:29—35.

(收稿日期:2005-08-08)



图1-1 对照组成骨细胞TUNEL染色  
细胞形态正常 (400 ×)。



图1-2 血清饥饿组可见细胞核  
内有较多紫兰色颗粒的阳性细胞 (400 ×)。



图1-3 血清饥饿+雌激素组细胞  
核内有紫兰色颗粒的阳性细胞  
明显减少 (400 ×)。



图2-1 对照组大鼠心肌组织切片  
HE染色 (40 ×)。A. 细胞核, B. 红  
细胞, C. 明暗相间的横纹。