

论著·基础研究

雌激素对骨髓单核巨噬细胞增殖、凋亡和分化的影响

赵婧羽, 黄明健, 张晓玲

上海交通大学 医学院附属新华医院骨科, 上海 200092

【摘要】目的·探究雌激素对骨髓单核巨噬细胞 (bone marrow macrophage, BMM) 的增殖、凋亡和破骨分化的影响及其作用机制。**方法**·分离正常 C57BL/6J 小鼠 BMM, 体外诱导分化为成熟的破骨细胞 (osteoclast, OC)。外源性给予 10^{-8} mol/L β -雌二醇的为实验组, 同时加入雌二醇和 1 μ mol/L 雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 拮抗剂 ICI-182780 的为抑制剂组, 另设对照组。用 12 周龄的 C57BL/6J 小鼠建立双侧卵巢摘除 (ovariectomized, OVX) 模型 (OVX 组, $n=5$), 同时设假手术组 (sham 组, $n=5$)。术后 3 个月取其 BMM 体外培养并诱导破骨分化。利用 Prestoblue 检测 BMM 的增殖能力, TUNEL 染色检测其凋亡情况, Western blotting 检测凋亡相关蛋白 caspase 3 和 caspase 8。实时定量 PCR 检测成熟 OC 标志物抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, *Trap*) 和组织蛋白酶 K (cathepsin K, *Ctsk*) mRNA 水平的变化, 细胞 TRAP 染色分析 BMM 破骨分化能力。Western blotting 检测 BMM 被核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 激活的下游信号通路。**结果**·实验组 BMM 增殖能力比对照组弱, OVX 组 BMM 增殖能力比 sham 组强。TUNEL 染色显示实验组 BMM 中细胞凋亡率显著高于对照组, caspase 3 和 caspase 8 的蛋白水平与该结果一致。PCR 结果显示实验组 *Trap* 和 *Ctsk* 的 mRNA 水平显著低于对照组。OVX 组的相关 mRNA 水平明显高于 sham 组。细胞 TRAP 染色和定量分析显示实验组比对照组的 BMM 破骨分化能力低, OVX 组比 sham 组的破骨分化能力强。雌激素对 BMM 增殖、凋亡和破骨分化的影响均可被 ER 拮抗剂阻断。Western blotting 结果显示, 给予 RANKL 后实验组 BMM 的 I κ B α /p65、JNK 磷酸化水平相比对照组均降低。**结论**·雌激素能抑制 BMM 增殖和破骨分化, 促进 BMM 凋亡, 且这一作用是通过 ER 介导的。

【关键词】骨髓单核巨噬细胞; 破骨细胞; 雌激素; 雌激素受体**【DOI】** 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.07.005 **【中图分类号】** Q291 **【文献标志码】** A

Effects of estrogen on proliferation, apoptosis and differentiation of bone marrow macrophage

ZHAO Jing-yu, HUANG Ming-jian, ZHANG Xiao-ling

Department of Orthopedic Surgery, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

【Abstract】Objective·To investigate the effects of estrogen on proliferation, apoptosis and differentiation of bone marrow macrophage (BMM) and the mechanism. **Methods**·BMMs were isolated from normal C57BL/6J mice and induced to differentiate to osteoclasts *in vitro*. BMMs in experimental group were administered with 10^{-8} mol/L exogenous estrogen and antagonist group with both estrogen and 1 μ mol/L ICI-182780, an antagonist of estrogen receptor, and control group was designed as well. Five 12-week-old C57BL/6J mice underwent ovariectomy (OVX group) and sham group ($n=5$) underwent sham surgery. All mice were sacrificed after 3 months to isolate BMM. Proliferation ability of BMM was assessed using Prestoblue, TUNEL assay was performed to detect apoptosis in each group. Caspase 3 and caspase 8 were detected by Western blotting. Quantitative real time PCR was used to detect tartrate-resistant acid phosphatase (*Trap*) and cathepsin K (*Ctsk*) mRNA levels during osteoclastogenesis. TRAP staining of osteoclasts showed osteoclastogenesis ability. In addition, the downstream molecules activated by receptor activator for nuclear factor- κ B ligand (RANKL) in BMM were detected by Western blotting. **Results**·BMM multiplication ability was attenuated in experiment group compared with control group and it was stronger in OVX group than that in sham group. TUNEL assay showed that the apoptotic BMM in experimental group were more than those in control group and caspase 3 and caspase 8 expression were consisted with the results of TUNEL assay. PCR analysis showed that *Trap* and *Ctsk* mRNA levels significantly decreased in experiment group compared with control group. The mRNAs increased in OVX group in contrast to sham group. TRAP staining of osteoclasts and quantitative analysis showed that osteoclasts in experiment group were less than those in control group and osteoclasts in OVX group were more than those in sham group. The effects of estrogen on proliferation, apoptosis and differentiation of BMM were blocked by antagonist of estrogen receptor. Western blotting showed that the phosphorylation of I κ B α /p65 and JNK activated by RANKL were attenuated in experimental group compared with that in control group. **Conclusion**·Estrogen inhibits proliferation and osteoclastogenesis of BMM, and aggravates their apoptosis through estrogen receptor.

【Key words】bone marrow macrophage; osteoclast; estrogen; estrogen receptor**【基金项目】**国家自然科学基金 (81772347) (National Natural Science Foundation of China, 81772347)。**【作者简介】**赵婧羽 (1992—), 女, 硕士生; 电子信箱: zhaojingyu@sjtu.edu.cn。**【通信作者】**张晓玲, 电子信箱: xlzhang@shsmu.edu.cn。

绝经后骨质疏松是一种常见的骨代谢疾病,主要是由雌激素缺失引起的。雌激素缺乏主要通过影响破骨细胞(osteoclast, OC)的骨吸收能力从而影响骨体积和骨小梁结构的变化^[1-2]。OC由骨髓单核巨噬细胞(bone marrow macrophage, BMM)分化而来,成熟的OC能行使骨吸收的功能,参与骨转换并维持骨量稳定^[3-4]。近年来有大量的研究报道了雌激素对OC有抑制作用,并揭示了这一作用可能是通过雌激素受体(estrogen receptor, ER)介导的基因效应、Ca⁺介导的非基因效应和影响其他细胞的旁分泌等多种途径起效的^[4-9]。但雌激素是否影响BMM的功能尚未报道。本研究对小鼠BMM在体外给予雌激素刺激,并用ER抑制剂来阻断ER的功能,同时利用双侧卵巢摘除(ovariectomized, OVX)术构建雌激素缺失的小鼠模型,获得了雌激素缺失的BMM,探讨雌激素存在与缺失条件下BMM增殖、凋亡和破骨分化水平的变化,以及这些调控作用是否是通过ER介导。BMM的功能直接影响到体内OC的数量及活性,因此针对雌激素对BMM增殖、凋亡和破骨分化影响的研究能进一步帮助明确雌激素缺失对骨吸收影响的具体作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雌性C57BL/6J小鼠,8~12周龄,购自上海灵畅生物科技有限公司,饲养于中国科学院上海生命科学研究院健康所动物房,饲养环境为SPF级。生产许可证号为SCXK(沪)2013-0018,使用许可证号为SYXK(沪)2013-0062。

1.1.2 实验试剂 α -MEM培养基(SH30265.01,美国Hyclone),胎牛血清(FBS)(10100147,美国Gibco),青-链霉素溶液(15140,美国Gibco),70 μ m细胞过滤筛网(BD352350,美国BD Falcon),红细胞裂解液(C3702,中国碧云天),小鼠巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)(315-02,美国Peprotech),核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)(315-11C,美国Peprotech),TUNEL检测试剂盒(C1089,中国碧云天),Prestoblue染色液(A13261,澳大利亚Invitrogen),小鼠GAPDH抗体(14C10,美国CST),p38、ERK和JNK抗体(9926,美国CST),p65和IkK α / β 抗体(4766,美国CST),caspase 3和caspase 8抗体(12675,美国CST),ER α + β 抗体(bs-0174R,美国BIOSS),羊抗兔二抗抗体(bs-0295G,美国BIOSS),F4/80抗体(ab6640,

美国Abcam),硝酸纤维素(NC)膜(HATF00010,德国Millipore),Western blotting显影试剂盒(WBKLS0050,德国Millipore),SYBR实时PCR预混液(DRR820A,中国TaKaRa),反转录试剂(RR036Q,中国TaKaRa),抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)染色液(387A,美国Sigma), β -雌二醇(E2758,美国Sigma),ER拮抗剂ICI-182780(S1191,美国Selleck)。

1.1.3 实验仪器 正置荧光显微镜(德国Zeiss),ViiA7实时荧光定量PCR仪(美国ABI),流式细胞仪(美国Beckman Coulter)。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠BMM分离 将8周龄的雌性C57BL/6小鼠颈椎脱臼处死,取出后肢股骨及胫骨,剥离骨表面附着的多余的肌肉和软组织,PBS清洗3次。去除股骨和胫骨骨髓端,将骨髓从骨髓腔中冲出,用70 μ m滤网过滤,去除多余的组织碎片及细胞团块。将细胞悬液转移至50 mL离心管中,800 \times g离心5 min,弃上清。加入1 mL红细胞裂解液重悬细胞,静置1 min,500 \times g离心5 min,弃上清,加入10 mL PBS重悬,清洗残留的红细胞裂解液,重复3次直至洗净,用 α -MEM将细胞悬液种于培养皿。24 h后,吸取上清中的未贴壁细胞,800 \times g离心5 min,弃上清。用 α -MEM完全培养基重悬细胞后种于培养瓶中。加入细胞因子M-CSF(终浓度为25 ng/mL),细胞贴壁后直至其长满,每2 d换液1次,此时的贴壁细胞为BMM。

1.2.2 小鼠OVX模型的建立 取12周龄的雌性小鼠5只,用4%的水合氯醛按照每20 g体质量注射200 μ L的剂量腹腔注射麻醉小鼠。麻醉后的小鼠沿脊柱方向在背部中下方中间剪开纵向切口,镊子从背部探入小鼠腹腔,在肾下方找到双侧卵巢和子宫角,将卵巢与子宫连接处结扎,切除卵巢后缝合。假手术(sham)组小鼠($n=5$)只剪开皮肤和肌肉组织,再缝合。手术后小鼠放置于37 $^{\circ}$ C体温维持仪上直至苏醒。小鼠在术后30 d即表现出体内雌激素水平减少、骨量减少的症状。术后3个月取BMM。

1.2.3 小鼠体外破骨诱导 将BMM接种于12孔板,约 1×10^5 /孔,加入 α -MEM完全培养基,加入M-CSF(终浓度为25 ng/mL)、RANKL(终浓度为75 ng/mL),每2 d换液1次。OC在第4~6日形成。实验组给予 10^{-8} mol/L β -雌二醇^[10],抑制剂组给予 10^{-8} mol/L β -雌二醇和1 μ mol/L ER拮抗剂ICI-182780^[11],对照组不给予任何刺激。

1.2.4 Western blotting检测 12孔板加入RIPA裂解液100 μ L和100 mmol/L蛋白酶抑制剂1 μ L,刮下细胞碎

片, 冰上放置 30 min, 4 ℃ 12 000 × *g* 离心 10 min, 取上清加入 4 × SDS 上样缓冲液, 99 ℃ 煮 10 min。浓缩胶和分离胶采用 10% 预制胶。每孔上样蛋白量 20 μg, 电压 80 V 电泳。电泳结束后将凝胶与 NC 膜放在电泳槽转膜缓冲液中, 300 mA 恒流转膜 90 min。将 NC 膜取出, 置于封闭液 (4% 脱脂奶粉 + PBST) 中在摇床上缓慢摇晃孵育 1 h。将膜按蛋白不同的相对分子质量裁剪, 加入特定比例的一抗, 4 ℃ 摇床缓慢摇晃孵育过夜, PBST 洗净后加入二抗, 室温孵育 1 h。将配置好的显影液滴加到膜表面, 放入显影仪器中显影拍照。

1.2.5 实时定量 PCR 检测 按照 Trizol 试剂的说明书从小鼠 BMM 中提取总 RNA。测定 RNA 浓度后每个样本取 1 μg 进行反转录。反转录体系和试验方法参照说明书。反转录得到的 20 μL cDNA 用 ddH₂O 稀释 10 倍后, 根据 SYBR 说明书进行后续的实时定量 PCR (qPCR) 检测。*Gapdh* 上、下游引物序列分别为 5'-TGGATTGGACGCATTGGTC-3' 和 5'-TTTGCACCTGGTACGTGTTGAT-3', *Trap* 上、下游引物序列分别为 5'-GCAACATCCCCTGGTATGTG-3' 和 5'-GCAAACGGTAGTAAGGGCTG-3', 组织蛋白酶 K (cathepsin K, *Ctsk*) 上、下游引物序列分别为 5'-GAAGAAG-ACTCACCAGAAGCAG-3' 和 5'-TCCAGGTTATGGGC-AGAGATT-3', 原癌基因 *c-Myc* 上、下游引物序列分别为 5'-CGGACACACAACGTCTTGGA-3' 和 5'-AGGATGTAGGCGGTGGCTTTT-3'。得到 Ct 值, 以 *Gapdh* 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算分析 mRNA 相对表达量。

1.2.6 TUNEL 染色 细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBST 洗干净后用 0.5% Triton-100 通透 15 min。加入 TUNEL 染液 37 ℃ 避光孵育 1 h, DAPI 染液复染, 用 PBST 洗去多余的试剂, 用荧光封片剂封片后在显微镜下观察红色荧光。

1.2.7 细胞增殖能力检测 根据 Prestoblue 试剂的说明书

操作, 将 Prestoblue 加入活细胞中, 避光孵育 1 h, 吸取上清后于酶标仪中检测荧光值。荧光强度越大说明细胞增殖能力越强。

1.2.8 流式细胞术鉴定 用 0.25% Trypsin-EDTA 消化细胞 1 min, 用培养基终止反应, 1 000 × *g* 离心 5 min, 收集细胞并用含有 2.5% FBS 的 PBS 将细胞密度调整为 1×10^6 /mL。流式管每管加入 4×10^5 个细胞, PBS 补充至 1 mL, 4 ℃ 1 000 × *g* 离心 5 min。弃上清, 用 PBS (含 2.5% FBS) 重悬细胞, 避光加入 F4/80 抗体, 4 ℃ 孵育 45 min。加入 1 mL PBS (含 2.5% FBS), 4 ℃ 1 000 × *g* 离心 5 min, 弃上清, 上述操作再重复 1 次。加 100 μL PBS (含 2.5% FBS) 重悬细胞, 流式细胞仪检测。

1.2.9 免疫荧光染色 细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBST 洗净后用 0.5% Triton-100 通透 15 min。5% 牛血清白蛋白封闭 1 h, 加入 1:200 的 F4/80 一抗, 4 ℃ 过夜, PBST 洗净后加入荧光二抗, 室温孵育 1 h, DAPI 染核, PBST 洗净后, 用荧光封片剂封片, 在荧光显微镜下拍照。

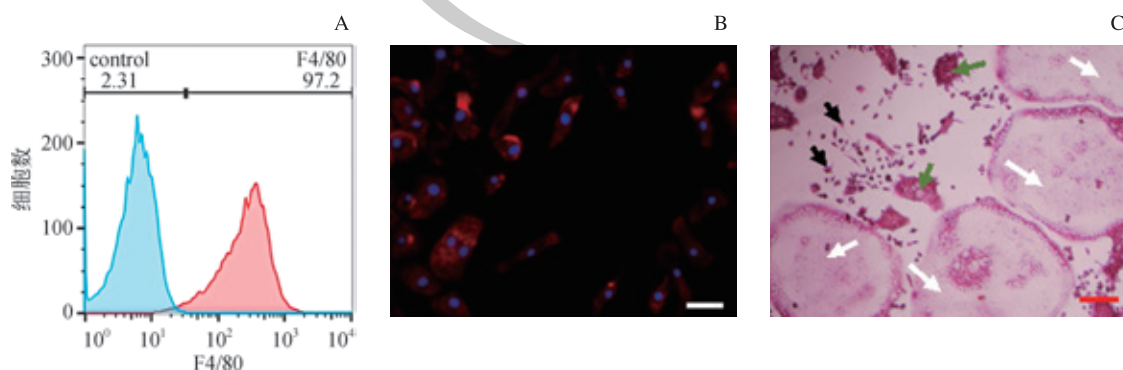
1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。*t* 检验分析 2 组间差异, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。所有实验均重复 3 次以上。

2 结果

2.1 BMM 与 OC 的鉴定

分离小鼠的 BMM, 并采用流式细胞术鉴定其标志物 F4/80, 发现 F4/80 阳性的细胞率达到 97.2% (图 1A)。同时用 F4/80 免疫荧光染色鉴定分离的小鼠 BMM (图 1B)。用细胞因子 RANKL 诱导小鼠 BMM 破骨分化, 经 TRAP 染色鉴定, 5 d 后可形成成熟的 OC (图 1C)。



注: A. 流式细胞术检测 BMM 标志物 F4/80; B. 免疫荧光染色 (BMM), 红色荧光为 F4/80, 蓝色为 DAPI 染色的细胞核, 标尺为 25 μm; C. TRAP 染色鉴定 (OC), 白色箭头所指为成熟 OC, 绿色箭头所指为正在分化过程中的 OC, 黑色箭头所指为未分化的 BMM, 标尺为 50 μm。

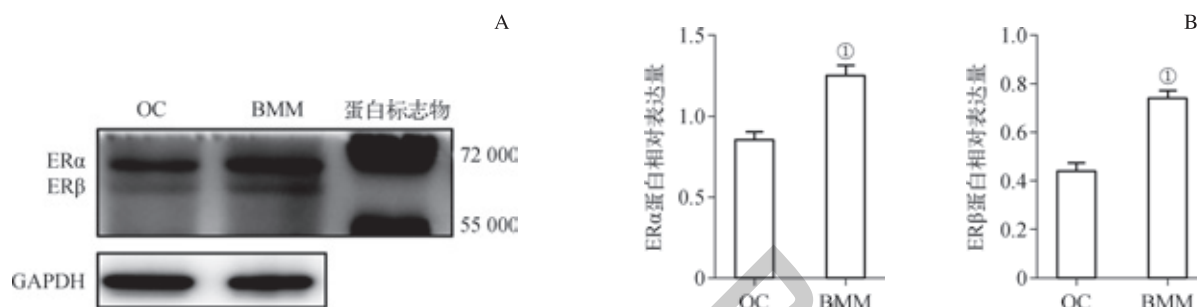
图 1 BMM 和 OC 鉴定

Fig 1 Identification of BMM and OC

2.2 ER 的表达

分离小鼠 BMM, 并用 M-CSF 和 RANKL 进行破骨分化诱导, 分化至第 5 日形成成熟的 OC。Western blotting 检测 BMM 和成熟 OC 中 ER 亚型 α 和 β 的表

量。以 GAPDH 为内参, 蛋白条带以及定量结果显示 ER α 和 ER β 在 BMM 中的表达量均显著高于成熟 OC 中的表达量 (均 $P=0.001$), 且 ER α 的表达量显著高于 ER β (图 2)。



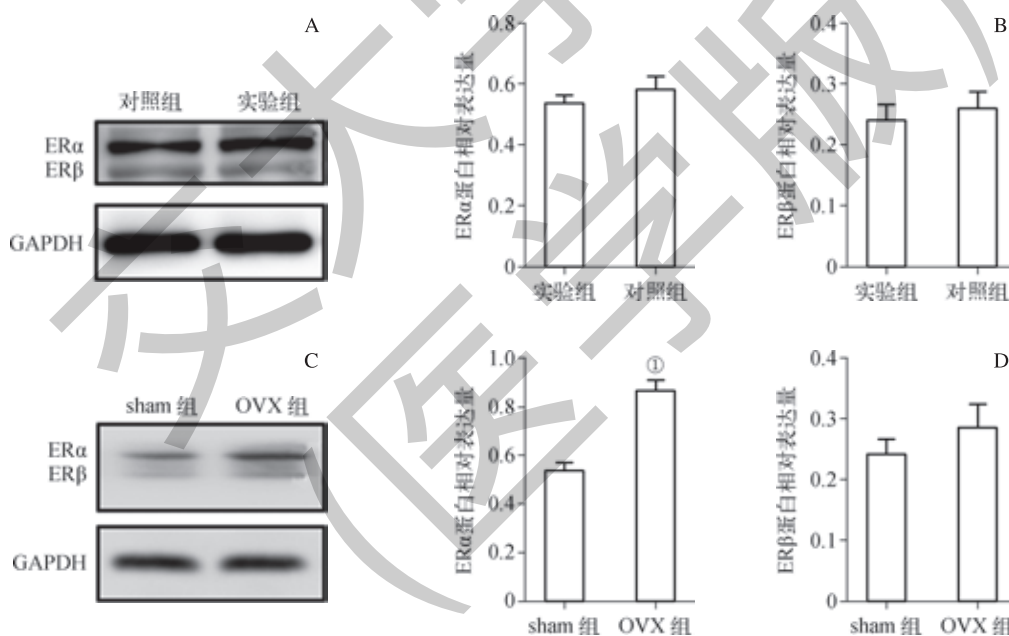
注: A. 蛋白条带; B. 蛋白表达量定量结果。^① $P=0.001$, 与 OC 比较。

图 2 ER α 和 ER β 在 BMM 和 OC 中的表达

Fig 2 Expression of ER α and ER β in OC and BMM

给予实验组 BMM 10^{-8} mol/L β -雌二醇刺激 48 h 后, 检测 ER α 和 ER β 的表达量, 发现 ER α 和 ER β 的表达与对照组间差异无统计学意义 (图 3A、B)。取 sham 组和 OVX

组小鼠的 BMM 按上述方法进行同样的检测, 发现在 OVX 组中 ER α 的表达量较 sham 组显著上调 ($P=0.000$), 而 ER β 的表达量并无明显变化 (图 3C、D)。



注: A. 实验组和对照组蛋白条带; B. 实验组和对照组蛋白相对表达量定量结果; C. sham 组和 OVX 组蛋白条带; D. sham 组和 OVX 组蛋白相对表达量定量结果。^① $P=0.000$, 与 sham 组比较。

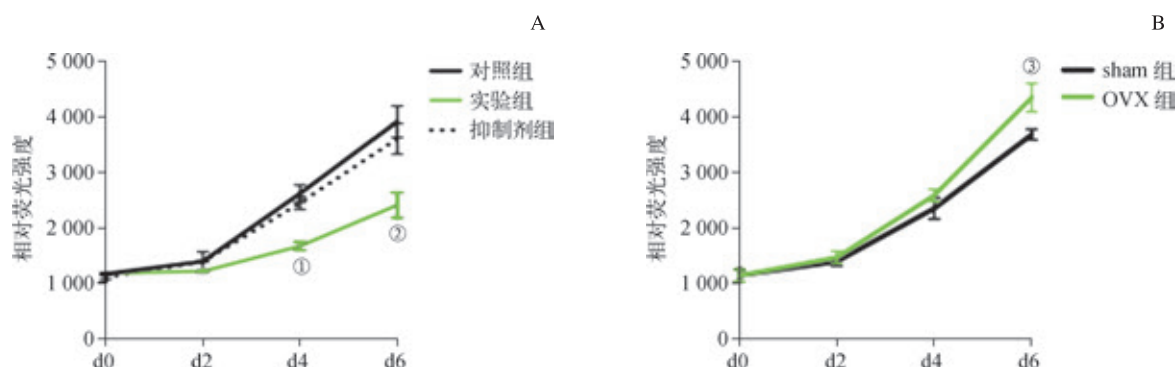
图 3 雌激素对 BMM ER α 和 ER β 表达的影响

Fig 3 Effects of estrogen on ER α and ER β in BMM

2.3 雌激素对 BMM 增殖的影响

将 BMM 以 10% 的密度接种于 12 孔板, 待细胞贴壁后将细胞分为实验组 (10^{-8} mol/L β -雌二醇)、抑制剂组 (10^{-8} mol/L β -雌二醇 + $1 \mu\text{mol/L}$ ICI-182780) 和对照组。刺激 24 h 后计为 d0, 在 d0、d2、d4、d6 分别将 Prestoblu 加入细胞中, 用上清中检测到的荧光强度表示

细胞增殖能力。结果发现实验组的 BMM 增殖能力在 d4 后显著弱于对照组 (均 $P<0.05$), 但抑制剂组的 BMM 增殖能力和对照组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图 4A)。取 sham 组和 OVX 组小鼠的 BMM 按上述方法进行同样的检测, 发现 OVX 组的 BMM 增殖能力在 d6 显著强于 sham 组 ($P=0.034$) (图 4B)。



注: A. 实验组、抑制剂组和对照组; B. sham 组和 OVX 组。① $P=0.003$, ② $P=0.002$, 与对照组相比; ③ $P=0.034$, 与 sham 组相比。

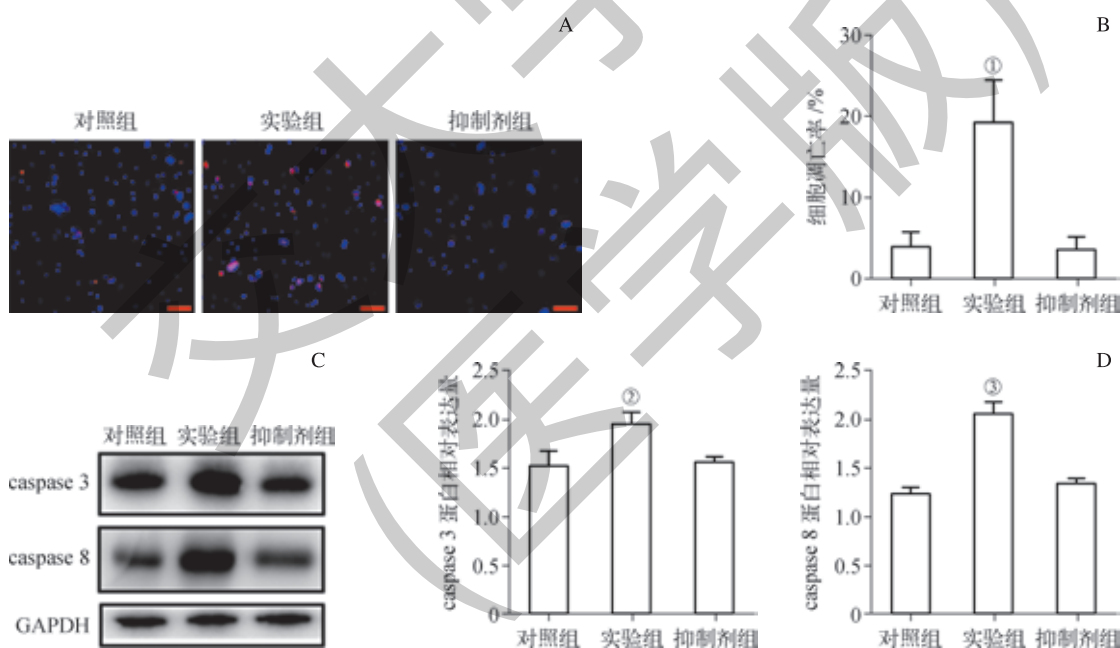
图 4 BMM 的增殖能力检测

Fig 4 Multiplication capacity test of BMM

2.4 雌激素对 BMM 凋亡的影响

对实验组、抑制剂组 BMM 刺激 48 h 后进行 TUNEL 染色, 发现实验组中呈红色荧光的细胞的数量显著多于对照组, 而抑制剂组的红色荧光细胞数与对照组比差异无统计学意义 (图 5A), 定量结果也显示实验组细胞凋亡率较

对照组显著增加 ($P=0.002$) (图 5B)。Western blotting 检测 3 组细胞凋亡相关蛋白的表达, 以 GAPDH 为内参, 蛋白条带以及定量结果显示实验组中的 caspase 3 和 caspase 8 的表达量均高于对照组 (均 $P<0.05$), 而抑制剂组与对照组比较差异无统计学意义 (图 5C、D)。



注: A. TUNEL 染色, 蓝色荧光为 DAPI 染色的细胞核, 红色荧光为 TUNEL 染色阳性的凋亡细胞, 标尺为 50 μm ; B. TUNEL 染色定量分析; C. caspase 3、caspase 8 蛋白条带; D. caspase 3、caspase 8 蛋白定量统计。① $P=0.002$, ② $P=0.010$, ③ $P=0.004$, 与对照组相比。

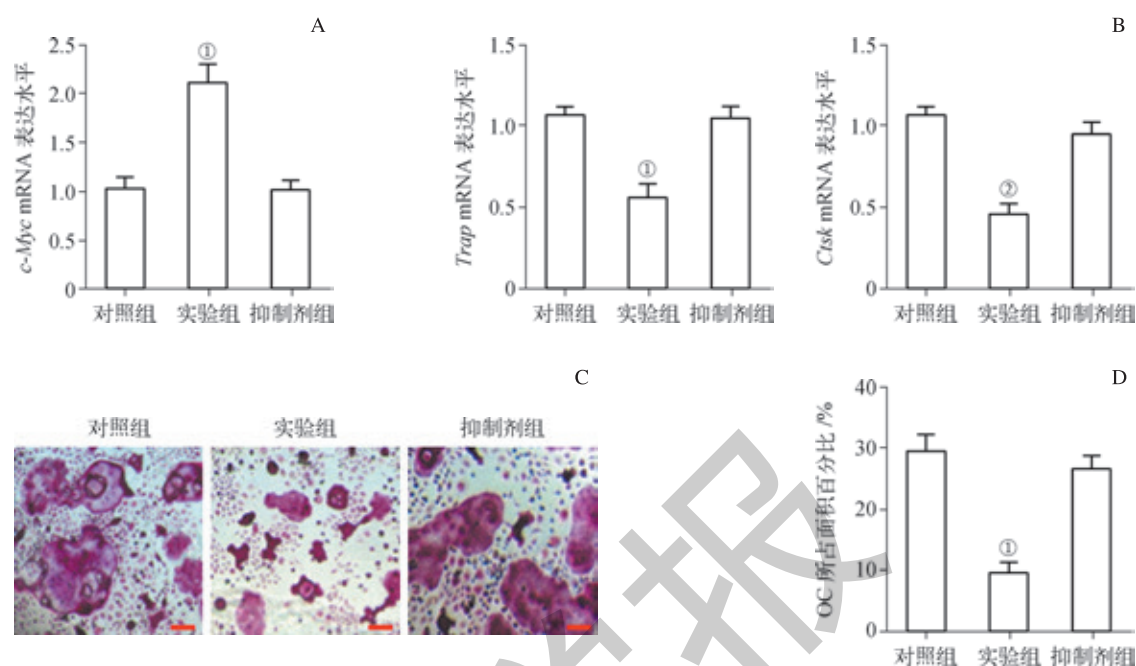
图 5 BMM 凋亡检测

Fig 5 Detection of BMM apoptosis

2.5 雌激素对 BMM 破骨分化的影响

实验组、抑制剂组和对照组 BMM 给药后 24 h, 检测 ER 下游的靶基因 *c-Myc*, 结果显示雌激素能激活其受体下游靶基因 *c-Myc* ($P=0.001$), 抑制剂组的 *c-Myc* mRNA 水平与对照组相比, 差异无统计学意义 (图 6A)。在 3 组细胞中同时加入 M-CSF 和 RANKL 诱导 BMM 破骨分化, 4 d 后

qPCR 检测 OC 标志物 *Trap* 和 *Ctsk*。结果显示实验组的 *Trap* 和 *Ctsk* 表达显著低于对照组 (均 $P<0.05$), 但抑制剂组与对照组相比差异无统计学意义 (图 6B)。TRAP 染色显示实验组中的 TRAP 阳性细胞数量明显少于对照组, 且 OC 的面积也明显小于对照组 ($P=0.001$), 但加入 ER 抑制剂后, OC 数量及面积与对照组相比, 差异无统计学意义 (图 6C、D)。



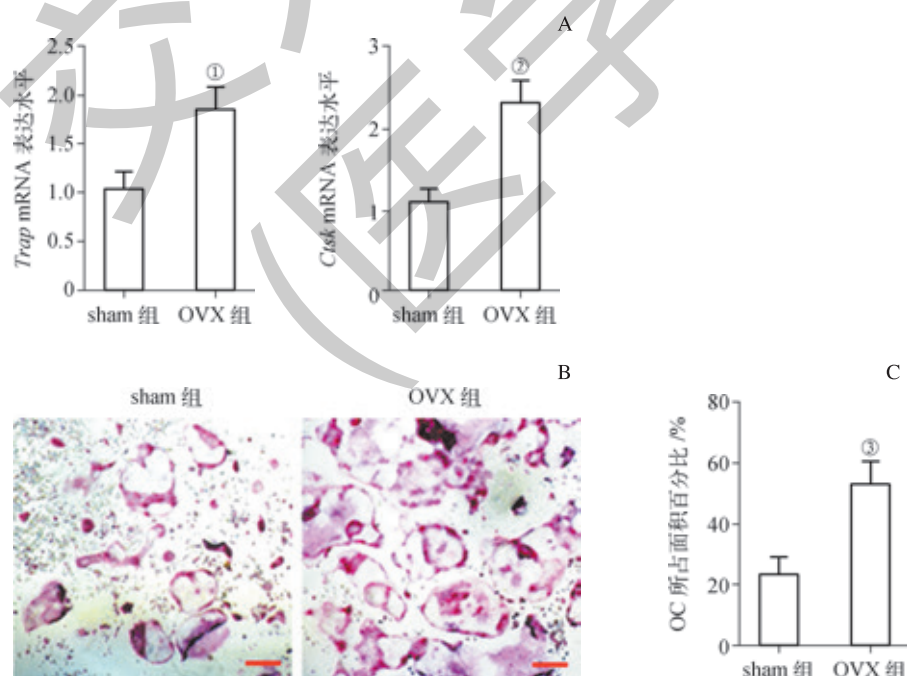
注: A. *c-Myc* mRNA 表达水平。B. *Trap* 和 *Ctsk* mRNA 表达水平。C. 诱导 BMM 破骨分化后的 TRAP 染色, 标尺为 50 μ m。D. TRAP 染色中 OC 所占面积的定量分析。① $P=0.001$, ② $P=0.000$ 与对照组相比。

图 6 雌激素对 BMM 破骨分化的影响

Fig 6 Effects of estrogen on osteoclast differentiation of BMM

从 sham 组和 OVX 组的小鼠体内分离 BMM, 体外诱导破骨分化, qPCR 检测 *Trap* 和 *Ctsk* mRNA 表达。结果显示 OVX 组的 *Trap* 和 *Ctsk* 表达显著高于 sham 组 (均

$P<0.05$) (图 7A)。TRAP 染色显示 OVX 组中的 TRAP 阳性细胞数量明显多于 sham 组, 且 OC 所占面积也显著大于 sham 组 ($P=0.005$) (图 7B、C)。



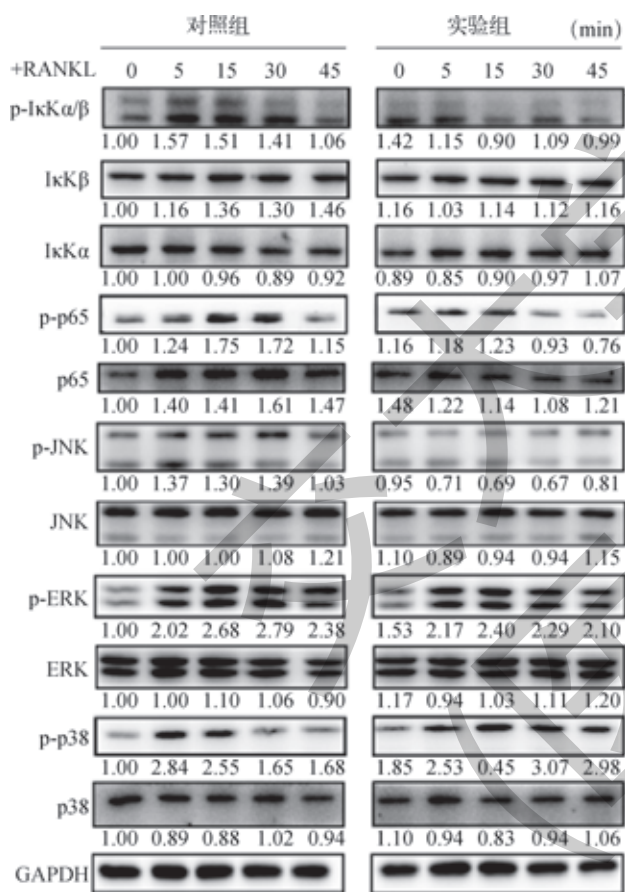
注: A. *Trap* 和 *Ctsk* mRNA 表达水平; B. 诱导 BMM 破骨分化后的 TRAP 染色, 标尺为 100 μ m; C. TRAP 染色中 OC 所占面积的定量分析。① $P=0.009$, ② $P=0.003$, ③ $P=0.005$, 与 sham 组比较。

图 7 雌激素缺失对 BMM 破骨分化的影响

Fig 7 Effects of estrogen deficiency on osteoclast differentiation of BMM

2.6 雌激素对 BMM 中被 RANKL 激活的相关信号通路的影响

实验组 BMM 给予 10^{-8} mol/L β -雌二醇 24 h, 然后在无血清培养基中饥饿处理 12 h 后加入 RANKL (终浓度为 50 ng/mL), 在 0、5、15、30 和 45 min 收集蛋白样品, Western blotting 检测 NF- κ B 和 MAPK 信号通路的相关蛋白磷酸化情况。结果显示实验组 BMM 的 I κ K α / β 和 JNK 的磷酸化程度明显低于对照组; ERK 的磷酸化水平比对照组低, 但差异不明显; p38 的磷酸化水平不仅没有降低, 反而升高; 实验组的 p65 总蛋白和磷酸化蛋白水平均比对照组降低 (图 8)。



注: 条带下方的数字为定量结果。

图 8 雌激素对 BMM 中被 RANKL 激活的信号通路的影响

Fig 8 Effect of estrogen on signal pathways activated by RANKL in BMM

3 讨论

绝经后骨质疏松是一种全身性的骨骼病变, 病理特征是骨矿物质含量下降、骨微细结构破坏, 其后果是骨折危险性显著增加。其生理学机制是由于雌激素缺失后, 成骨细胞的骨形成能力和 OC 的骨吸收能力之间失衡造成

的^[12]。绝经后骨质疏松是一种高骨转换率型的骨质疏松, 其骨形成能力和骨吸收能力均增加, 但骨吸收速率远远大于骨形成能力, 因此形成了骨质疏松^[4]。

OC 是由 BMM 分化而来, BMM 在受到 M-CSF 刺激后形成破骨前体细胞, 破骨前体细胞受到 RANKL 刺激后, 单个核细胞开始聚集融合, 随后分化为具有骨吸收活性的 OC^[3, 13]。我们检测了 BMM 的标志物 F4/80 和 OC 的标志物 TRAP 以鉴定分离的细胞。雌激素对细胞的调节作用主要通过 ER 介导, 且 ER 分为 α 和 β 2 个亚型^[14]。Khalid 等^[6]报道 ER 在破骨前体细胞和成熟 OC 内均有分布, 但其是否在 BMM 内表达尚不明确。因此我们检测了 ER α 和 ER β 在 BMM 和成熟 OC 内的分布, 结果证实了两者在 BMM 中的表达量均高于成熟 OC, 且 ER α 的表达量要高于 ER β 。这提示了雌激素可能通过调节 BMM 来影响 OC 的骨吸收。随后我们又检测了雌激素对 ER α 和 ER β 的影响, 结果发现外源性的雌激素对 ER α 和 ER β 的表达均无影响。但 OVX 后的小鼠 BMM 中 ER α 的表达量比 sham 组明显上调, ER β 的表达量无明显变化, 这可能与机体自我调节受体的含量有关; 当雌激素急剧减少时, 机体会通过上调其受体的表达量来维持体内细胞的正常功能。我们还发现雌激素能抑制 BMM 细胞增殖, 但当加入 ER 拮抗剂后, 这一抑制作用消失, 这说明雌激素对 BMM 增殖的抑制作用是通过 ER 介导的。同时, 雌激素缺失后 BMM 的增殖能力减弱。

雌激素对 OC 凋亡也有重要作用, Nakamura 等^[7]报道雌激素能通过 FasL/Fas 途径促进成熟的 OC 凋亡。Hughes 等^[5]也报道微环境中的 TGF- β 能促进成熟的 OC 凋亡。但目前雌激素对 BMM 凋亡是否有影响尚不明确。我们的研究发现雌激素刺激使 BMM 中凋亡细胞数量增多, 细胞凋亡相关蛋白 caspase 3 和 caspase 8 均明显上调, 这说明雌激素不仅能导致成熟 OC 凋亡, 也能诱导 BMM 凋亡。然而这一促凋亡作用能被 ER 拮抗剂抑制, 说明雌激素对 BMM 的凋亡作用也是通过 ER 引起的。

以往的研究大多针对雌激素和 OC 之间的作用。雌激素能通过 ER 直接影响成熟的 OC 发挥作用, 也能影响破骨前体细胞的分化能力^[14-16]。同时, 雌激素缺失后, 骨微环境中的细胞因子如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、M-CSF、RANKL 等能通过旁分泌途径刺激 OC 分化并增强 OC 的功能^[8, 17-19]。但尚未有研究证明雌激素对 BMM 的直接作用及具体机制。我们检测了 ER 下游的靶基因 *c-Myc* 来证明雌激素对 ER 的激活作用。我们又通过对 BMM 外源性给予雌激素刺激并检测其破骨分化能力, 发现给予雌激素刺激的 BMM 分化成 OC 的能力明显减弱, 但在加入了 ER 拮

抗剂后雌激素对 BMM 分化的抑制作用消失。这说明了 ER 能介导雌激素对 BMM 分化的作用。为了进一步证实雌激素对 BMM 的作用, 我们又从雌激素缺失的 OVX 小鼠体内分离 BMM 体外诱导破骨分化, 结果也证实雌激素缺失后 BMM 的破骨分化能力增强。这提示了雌激素对 BMM 向 OC 分化有直接抑制作用。

关于雌激素影响破骨分化的相关机制, 有一些文献报道了破骨分化相关基因的启动子区域存在一些转录因子的结合位点, 如 AP-1、SP-1、C/EBP 和 NF- κ B 等^[19-20]。Umayahara 等^[9]报道转录因子 c-jun 能与 *Trap* 基因的启动子结合位点 AP-1 相结合, 且雌激素能下调 c-jun 以抑制破骨前体细胞向 OC 分化。但是雌激素在 BMM 中影响哪条信号通路并不明确。RANKL 是刺激 BMM 破骨分化过程中最重要的细胞因子, 其与 NF- κ B 受体活化因子 (receptor activator for nuclear factor- κ B, RANK) 结合后, 激活胞内相关蛋白结合区域肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6), 从而介导下游的信号通路^[21-22]。NF- κ B 和 MAPK 信号通路是与破骨分

化密切相关的信号通路。因此我们检测了 BMM 中 NF- κ B 信号通路中的 IkK α / β 和 p65, 以及 MAPK 信号通路中的 JNK、ERK 和 p38 的磷酸化是否受雌激素调控。结果证实, 雌激素能明显抑制 IkK α / β 和 JNK 的磷酸化, 但对 ERK 的抑制作用不明显, 说明雌激素对 BMM 分化的抑制作用可能主要是通过 IkK α / β 和 JNK 下游的分子来调控的, ERK 可能并不占主导作用。相反, p38 的磷酸化水平不仅没有被抑制反而升高, 这提示雌激素可能不是通过 p38 及其下游的途径来影响 BMM 功能的。但值得注意的是, p65 总蛋白和磷酸化蛋白水平均能被雌激素抑制, 这提示了雌激素可能还影响 p65 本身的基因转录和翻译, 因此抑制了 p65 的总蛋白水平。

本研究证实了雌激素对 BMM 的增殖、凋亡和分化的作用, 说明雌激素不仅对 OC 本身有影响, 也可以追溯到其来源的 BMM。同时我们又利用 ER 拮抗剂验证了雌激素对 BMM 的增殖、凋亡和分化的作用是通过 ER 介导的。这进一步阐述了雌激素影响骨吸收作用的机制, 同时也为绝经后骨质疏松的治疗提供了一个新方向。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis[J]. N Engl J Med, 1995, 332(5): 305-311.
- [2] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future[J]. Lancet, 2011, 377(9773): 1276-1287.
- [3] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation[J]. Nature, 2003, 423(6937): 337-342.
- [4] Almeida M, Laurent MR, Dubois V, et al. Estrogens and androgens in skeletal physiology and pathophysiology[J]. Physiol Rev, 2017, 97(1): 135-187.
- [5] Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, et al. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β [J]. Nat Med, 1996, 2(10): 1132-1136.
- [6] Khalid AB, Krum SA. Estrogen receptors α and β in bone[J]. Bone, 2016, 87: 130-135.
- [7] Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor α and induction of Fas ligand in osteoclasts[J]. Cell, 2007, 130(5): 811-823.
- [8] Srivastava S, Weitzmann MN, Kimble RB, et al. Estrogen blocks *M-CSF* gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1[J]. J Clin Invest, 1998, 102(10): 1850-1859.
- [9] Umayahara Y, Kawamori R, Watada H, et al. Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer[J]. J Biol Chem, 1994, 269(23): 16433-16442.
- [10] Zhang Y, Wei F, Zhang J, et al. Bisphenol A and estrogen induce proliferation of human thyroid tumor cells via an estrogen-receptor-dependent pathway[J]. Arch Biochem Biophys, 2017, 633: 29-39.
- [11] He X, Andersson G, Lindgren U, et al. Resveratrol prevents RANKL-induced osteoclast differentiation of murine osteoclast progenitor RAW 264.7 cells through inhibition of ROS production[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 401(3): 356-362.
- [12] Manolagas SC. Steroids and osteoporosis: the quest for mechanisms[J]. J Clin Invest, 2013, 123(5): 1919-1921.
- [13] Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, et al. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D[J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1473-1480.
- [14] Manolagas SC, O'Brien CA, Almeida M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease[J]. Nat Rev Endocrinol, 2013, 9(12): 699-712.
- [15] Lee EJ, Kim JL, Kim YH, et al. Phloretin promotes osteoclast apoptosis in murine macrophages and inhibits estrogen deficiency-induced osteoporosis in mice[J]. Phytomedicine, 2014, 21(10): 1208-1215.
- [16] Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, et al. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis[J]. Nat Med, 2012, 18(3): 405-412.
- [17] Takegami N, Akeda K, Yamada J, et al. RANK/RANKL/OPG system in the intervertebral disc[J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 121.
- [18] Zheng SX, Vrindts Y, Lopez M, et al. Increase in cytokine production (IL-1 β , IL-6, TNF- α but not IFN- γ , GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis[J]. Maturitas, 1997, 26(1): 63-71.
- [19] Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, et al. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6[J]. Science, 1992, 257(5066): 88-91.
- [20] Feng Y, Zhao H, Luderer HF, et al. The LIM protein, Limd1, regulates AP-1 activation through an interaction with Traf6 to influence osteoclast development[J]. J Biol Chem, 2007, 282(1): 39-48.
- [21] Walsh MC, Kim GK, Maurizio PL, et al. TRAF6 autoubiquitination-independent activation of the NF κ B and MAPK pathways in response to IL-1 and RANKL[J]. PLoS One, 2008, 3(12): e4064.
- [22] Xu D, Wang S, Liu W, et al. A novel receptor activator of NF- κ B (RANK) cytoplasmic motif plays an essential role in osteoclastogenesis by committing macrophages to the osteoclast lineage[J]. J Biol Chem, 2006, 281(8): 4678-4690.

[收稿日期] 2018-03-08

[本文编辑] 瞿麟平

