

· 基础研究 ·

补肾法对卵巢切除大鼠骨组织白细胞介素-6 mRNA 表达的影响

沈霖 杜靖远 涂意辉 杨艳萍 谢晶 周丕琪
(华中科技大学同济医学院附属协和医院, 湖北 武汉 430022)

【摘要】 目的 探讨补肾法治疗绝经后骨质疏松症的分子作用环节。方法 以卵巢切除大鼠作为骨质疏松实验模型, 通过斑点杂交技术, 在 mRNA 水平分析模型组、密骨片组及假手术组白细胞介素-6 (IL-6) 表达。通过原位杂交技术, 研究了 IL-6 mRNA 在骨组织细胞的分布。结果 模型组大鼠 IL-6 mRNA 表达较假手术组明显升高 ($P < 0.01$); 而密骨片组治疗后 IL-6 mRNA 表达明显下降 ($P < 0.01$)。IL-6 mRNA 主要在成骨细胞、骨衬里细胞和骨细胞胞浆内表达。结论 IL-6 在骨质疏松骨丢失过程中起重要作用; 补肾法抗骨质疏松疗效部分是通过降低 IL-6 产生而介导的。

【关键词】 骨质疏松, 绝经后; 卵巢切除术; 中医现代化

Effects of kidney invigoration method on expression of interleukin-6 mRNA in bone of ovariectomized rats
SHEN Lin, DU Jing-yuan, TU Yi-hui, et al. Xiehe Affiliated Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology (Hubei Wuhan, 430022)

【Abstract】 Objective To investigate the molecular links of the treatment with kidney invigoration method on postmenopausal osteoporosis in vivo. **Methods** Adult ovariectomized rats were used in this study as the model of osteoporosis. Expression of interleukin-6 (IL-6) in bone tissue of sham operate (Sham), ovariectomy (OVX) and ovariectomy with Migu tablet (OVX + MGT) rats was analysed at mRNA level using dot blot hybridization. The distribution of IL-6 mRNA was studied by in situ hybridization. **Results** The expression of IL-6 was higher in bone tissue of OVX than that of Sham group ($P < 0.01$), while treated with MGT, the expression of IL-6 significantly declined compared with that in OVX group ($P < 0.01$). The in situ hybridization showed that IL-6 mRNA was mainly expressed in osteoblasts, lining cell and osteocytes. **Conclusion** These data indicate that IL-6 may play an important role in bone loss of osteoporosis. Suppression for IL-6 production was involved in the mechanism of kidney invigoration in the treatment of osteoporosis.

【Key Words】 Osteoporosis, postmenopausal; Ovariectomy; Moderation of TCM

雌激素撤除可导致成骨细胞分泌白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 增多^[1], 而 IL-6 能刺激破骨细胞的形成, 并通过此途径介导绝经后的快速骨丢失^[2]。我们前期的研究已表明, 补肾中药密骨片可部分减少卵巢切除大鼠骨髓上清 IL-6 的含量^[3], 降低绝经后骨质疏松症患者血清 IL-6 水平^[4]。本实验进一步研究了去卵巢大鼠骨组织 IL-6 mRNA 的分布、表达及中药补肾法的影响。

1 材料与方

1.1 实验动物 3月龄 SD 雌性大鼠 30 只, 体重 210~235g, (同济医科大学实验动物中心提供, II 级动物), 随机分为三组, 每组 10 只。试验鼠均用 1% 戊巴比妥钠 (50mg/kg) 腹腔麻醉, 经双侧腹部小切口暴露双侧卵巢。假手术组 (Sham) 仅切除腹腔内小段肠系膜; 卵巢切除组 (OVX) 摘除双侧卵巢;

密骨片治疗组 (OVX + MGT) 摘除卵巢 24 小时后每天灌胃法给服密骨片浸膏 (附方: 淫羊藿、杜仲、胡桃肉、干地黄、天花粉、淮牛膝等量, 由本院药剂科制备) 3.3g/kg (相当生药量 10g/kg)。术后第 61 天, 所有动物被处死。无菌条件下, 取出双侧股骨, 剔除其上附着的软组织及软骨, 液氮中保存, 备提 RNA。右侧胫骨取材后, 行冰冻切片, 用于原位杂交。

1.2 cDNA 探针 含人全长 IL-6 cDNA 的重组质粒 pBS F2.5 (pGEM-4) 由日本国 Fanabe 博士惠赠。质粒全长 3.7kb, 载体片段长 2746bp, 其中 IL-6 cDNA 长 900bp 克隆点为 EcoRI, 具有 Amp 抗性 (图 1)。因大鼠 IL-6 基因结构与人类具有 60% 同源性, 因此可以用人 IL-6 cDNA 探针进行大鼠整体实验^[5]。IL-6 探针标记定量采用德国 Boehringer Mannheim (BM 公司) 提供的地高辛高效引物标记和检测试剂盒, 按说明书提供的随机引物标记技术进行。

1.3 RNA 的提取和斑点杂交 取出液氮中保存的骨组织,

咬成碎块,置于盛有液氮的碾钵内碾成粉末状。称取 200mg 骨粉末按文献^[6]建立的异硫脲胍-酚一步法提取细胞总 RNA。将 RNA 溶于适量 DEPC(Sigma 公司)处理的蒸馏水中,用 Hitachi U-2000 紫外分光光度仪测 260nm OD 值及 OD260nm/OD280nm, OD260nm/OD230nm 比值,确定 RNA 的浓度及纯度。提取的 RNA 在 -80℃ 保存。

将 DNA 标本浓度调至 1μg/μl,取 10μl 与 20× SSC(1× SSC:0.15M NaCl,0.015M 柠檬酸钠),100% 甲酰胺(Serva 公司)20μl,37% 甲醛 7μl 混合,于 68℃ 温育 15min,制备成甲醛变性 RNA 液,点样于硝酸纤维素膜(Gelman 公司),置 80℃ 烤 2h 后,将其放入预杂交袋内,加入 10ml 由 20× SSC,100% 甲酰胺,2% 十二烷基肌氨酸(Sigma 公司),10% SDS(Serva 公司)配制的预杂交液中,42℃ 预杂交 2 小时,再加入 100℃ 变性的地高辛标记探针,于 42℃,60rpm/min 振荡杂交 16 小时。2× SSC/0.1% SDS 室温下洗 5min×2。显色方法按 BM 公司试剂盒说明书进行。用同济-太阳 MPIAS-500 图像分析系统测定斑点着色灰度。

1.4 原位杂交 大鼠右侧胫骨上段取材后,置 10% EDTA/PBS(pH7.4)脱钙 3 周,用 Jung Frigocut 2800 E 恒冷箱切片机制作 25μm 厚骨切片,裱片于已硅化的载玻片上,4% 多聚甲醛固定 20 分钟,PBS 冲洗。1μg/ml 蛋白酶 K(Promega 公司)

消化 30min,0.1M 甘氨酸/PBS 室温下 10 分钟中止反应。切片上滴加预杂交液,42℃ 湿盒中预杂交 2 小时。地高辛标记探针煮沸变性 10 分钟后,与杂交液混合(探针浓度 5μg/ml),每张切片上滴加变性杂交液 20μl,42℃ 内杂交 16 小时。切片滴加 1:1000 稀释碱性磷酸酶标记抗地高辛抗体,22℃,4 小时;NBT 和 BICP(Promega 公司)室温显色 30min,树脂胶封片。

2 结果

2.1 RNA 斑点杂交结果 各组动物骨组织 IL-6 RNA 斑点杂交结果见图 2。三组动物斑点着色强度不同是由于相应 mRNA 含量存在差异所致,其中 OVX 组最强,表明骨质疏松骨组织 IL-6 表达增强。密骨片治疗后两者斑点着色下降。

各组杂交斑点密度结果见图 3。OVX 组较 Sham 组 IL-6 表达升高 2.4 倍(P<0.01);密骨片治疗后,IL-6 表达较 OVX 组下降(P<0.01)。

2.2 原位杂交 为了确定 IL-6 在骨组织中的表达状况,本研究进行了脱钙骨冰冻切片的原位杂交。结果 IL-6 mRNA 主要位于骨基质表面衬细胞,成骨细胞胞浆内,一些骨细胞胞浆中亦见有杂交信号。原位杂交阴性对照切片未见明显杂交信号,说明杂交反应确为 cDNA 探针与相应 mRNA 杂交所产生。

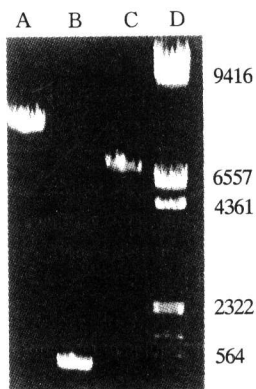


图 1 含 IL-6 片段的质粒酶切图

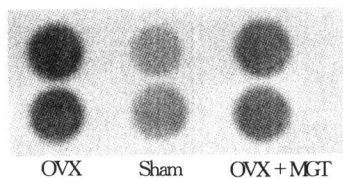
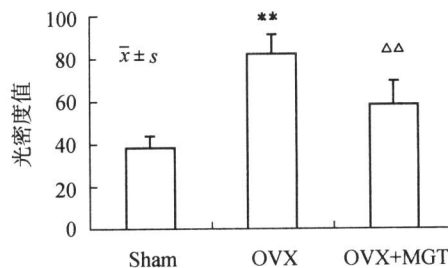


图 2 骨组织 IL-6 RNA 斑点杂交



** 与 Sham 比较 P<0.01, ΔΔ 与 OVX 比较 P<0.01

3 讨论

IL-6 是骨吸收的诱导剂,与绝经后骨转换不平衡有着密切关系,激素可能通过控制 IL-6 的产生而调节骨转换^[2]。Passeri 等^[7]通过体外实验证实,鼠基质细胞和成骨细胞分泌 IL-6,激素撤除导致 IL-6 产生增加,但加入雌激素后,IL-6 的分泌被抑制。Tamura 等^[8]认为 IL-6 在调节破骨细胞性骨吸收中起着重要作用,IL-6 不仅能促进破骨细胞前细胞的形成,而且还能刺激破骨细胞的募集,导致骨吸收增加。有学者发现,接种了转染鼠 IL-6 基因的中华鼠卵巢细胞的裸鼠,在术后呈现血钙明显升高,并与血浆 IL-6 浓度升高一致^[9]。而 IL-6 基因敲除大鼠,在卵巢切除后,没有产生破骨细胞形成增加和骨丢失^[10]。另外,用 IL-6 中和抗体处理卵巢切除大鼠,可阻止骨丢失的发生^[9]。这些说明,IL-6 在雌激素缺乏

导致的骨量下降方面起着非常重要的作用。

IL-6 通过特殊的 IL-6 受体而产生生理功能。IL-6 与可溶性受体结合导致信号传导子(gp130)同源二聚化,这种受体家族成员的组装激活细胞内一系列激酶,通过蛋白质酪氨酸磷酸化,产生信号传导,而发挥生理功能^[2,9]。

本实验利用已建立的骨质疏松模型,通过 RNA 斑点杂交,检测体内骨组织 IL-6 表达的变化,实验结果提示,卵巢切除导致骨组织 IL-6 mRNA 表达升高,与对照组比较,IL-6 mRNA 表达升高 2.4 倍,而补肾法治疗使骨组织 IL-6 mRNA 表达受到抑制,与卵巢切除组比较,中药治疗组 IL-6 mRNA 显著下降(P<0.01)。结合前期研究结果^[2],卵巢切除导致骨髓上清 IL-6 水平升高,与本文卵巢切除导致骨组织 IL-6 mRNA 表达升高一致,说明骨髓上清 IL-6 水平是由骨组织稳

态 IL-6 mRNA 表达决定的。而密骨片能调节卵巢切除大鼠骨组织 IL-6 的表达^[3,4]。

文献表明,骨组织匀浆提取的细胞总 RNA 除来源于骨细胞外,还来源于骨髓细胞。卵巢切除并没有导致鼠骨髓细胞 IL-6 mRNA 稳态水平的升高,破骨细胞也不是 IL-6 的主要来源,故卵巢切除导致骨组织 IL-6 mRNA 稳态水平的升高可能与成骨细胞有关^[2,9]。原位杂交可判断产生细胞因子的细胞,同时也有助于细胞在骨微环境中的定位。查阅文献,国外有人通过原位杂交研究人活检骨组织标本中 IL-6 mRNA 表达,其杂交信号主要位于成骨细胞^[10]。本实验研究了骨质疏松模型大鼠骨组织 IL-6 mRNA 原位杂交,结果显示 IL-6 mRNA 杂交信号除位于成骨细胞外,也在骨衬里细胞和部分骨细胞胞浆内呈高表达。Martin TJ 认为成骨细胞家族由成骨的、具有合成功能的成骨细胞及骨衬里细胞和骨细胞组成。通过骨小管,这三种细胞彼此发生功能联系^[11]。因此卵巢切除导致骨组织 IL-6 mRNA 稳态水平升高可能是由上述三种细胞 IL-6 mRNA 水平升高决定的。即成骨细胞、骨衬里细胞和骨细胞通过细胞与细胞之间的接触及分泌一些可溶性细胞因子如 IL-6,为破骨细胞生成提供一个合适的微环境;雌激素作为细胞因子产生的抑制剂而减少骨组织细胞 IL-6 的分泌,控制破骨细胞的产生和激活;在雌激素缺乏时,这种抑制作用丧失,大量 IL-6 进入骨微环境,刺激更多的破骨细胞生成,导致骨吸收活性增强,骨小梁数目减少,骨量下降,骨生物力学性能降低。而用补肾中药治疗,抑制了 IL-6 分泌^[3,4],减轻了由于骨吸收增加而引起的骨结构、骨量、骨强度等的变化。本实验进一步证实了 IL-6 在去卵巢大鼠骨质疏松性骨吸收中起着关键作用,补肾药抗骨质疏松作用部分是通过降低 IL-6 产生而介导的。

参考文献

- 1 Abe T, Chow JW, Lean JM, et al. Estrogen do not restore bone loss after OVX in the rat. *J Bone Miner Res*, 1993, 8(7): 831
- 2 Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, et al. IL-6 is produced by osteoblast and induce bone resorption. *J Immunol*, 1990, 145(10): 3297.
- 3 沈霖, 杜靖远, 涂意辉, 等. 密骨片对卵巢切除大鼠内源性白细胞介素-6 的影响. *中医正骨*, 2000, 12(2): 3.
- 4 周丕琪, 沈霖, 杜靖远, 等. 补肾法对绝经后骨质疏松症患者 IL-6、TNF- α 的影响. *中国中医骨伤科*, 2000, 8(4): 1.
- 5 Fanabe O, Akira S, Kamiya T, et al. Genomic structure of the murine IL-6 gene: high degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human. *J Immunol*, 1988, 141(11): 3875.
- 6 王申五. 基因诊断技术. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版, 1992. 46-52.
- 7 Passeri G, Girasole G, Tilka RL, et al. Increased interleukin-6 production by murine bone marrow and bone cell after estrogen withdrawal. *Endocrinology*, 1993, 133(2): 822.
- 8 Tamura T, Udagava N, Takahashi N, et al. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1993, 90(4): 1194.
- 9 Black K, Garret IR, Mundy GR. Chinese hamster ovarian cell transfected with the murine interleukin-6 gene cause hypocalcemia as well as cachexia, leukocytosis and thrombocytosis in tumor-bearing mice. *Endocrinology*, 1991, 128(4): 2657.
- 10 Van Bezooijen RL, Farh-Sips HCM, Papapoulos SE, et al. IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and TNF- α Steady-state mRNA level analyzed by RT-PCR in bone marrow of gonadectomized mice. *J Bone Miner Res*, 1998, 13(2): 185.
- 11 Martin TJ. Hormones in the coupling of bone resorption and formation. *Osteoporosis Int*, 1993, 2(Suppl 1): 121.

(收稿: 2001-10-15 编辑: 李为农)

北京市京华行科贸有限责任公司

生产研制产品报价单

京药管械经营许 20000737 号 国医械广审(文)010145

一、牵引康复设备 (D)代表全电脑控制

1. JKF 系列多功能脊柱牵引康复床: 电脑程控, 腰椎、颈椎、全身静止、间歇牵引, 侧扳, 腰部热疗按摩, 下肢摇摆

II 型: 15660 元/台 III 型 19600 元/台 III A 型: 26500 元/台 III A(D) 型: 38000 元/台

IB 型: 8800 元/台 IB(D) 型: 19800 元/台 IC 型: 12000 元/台 IC(D) 型: 26600 元/台

2. FYC 系列伏卧式多功能腰椎治疗床: 屈膝伏卧位牵引、捶击、热疗一体化, 颈牵、下肢摇摆

III 型: 7660 元/台 III A 型: 9850 元/台 III A(D) 型: 29000 元/台

3. JQY 系列多功能颈椎牵引治疗仪: 颈牵、电针、热疗一体化

I 型: 5200 元/台 I (D) 型: 12600 元/台 I (K) 型: 8800 元/台 I C 家用型: 520 元/台

二、RLY-A 系列 BH 型中频热场针灸按摩仪

该系列产品均为电脑程控, I 型产品具有人工针灸的各种针法及按摩手法, 手法逼真、柔和、深沉, 力度等同人工。中频波渗透性强, 可调至较深层次的穴位及病灶处。III 型和 VI 型增设远红外线热疗、药物离子导入, 配有与人体各部位相吻合的药物模具。主治: 风湿病、腰椎间盘突出症、颈椎病、骨质增生、关节炎、急性扭挫伤、偏瘫肢体恢复等。

I 型: 6000 元/台 III 型: 9000 元/台(双功能型) VI 型: 12000 元/台(双功能智能型)

三、其它设备

1. XN 心脑血管检查治疗仪 III C 型 686 元/台 III A 型 2648 元/台 2. GZ 骨质增生药物电泳治疗仪 III C 型 428 元/台 III A 型 2896 元/台

3. FD 风湿治疗仪 III C 型 428 元/台 III A 型 2466 元/台 4. DJS 胆结石治疗仪 III C 型 486 元/台 III A 型 2576 元/台

邮购办法: (1) 邮局, 银行汇款均可, 款到后立即发货。(2) 厂家销售, 所售产品保修壹年, 长期维修。运费保险费由我方负责。(3) 面向全国常年办理邮购, 欢迎来函来电索取资料。公司地址: 北京市东城区校尉路 5 号文达写字楼 D213 室(王府井中央美术学院) 通信及邮局汇款地址: 北京市海淀区中关村南大街 12 号 128 信箱京华行公司 邮编: 100081 联系人: 徐照 电话: 010-65288924; 66031777 手机: 13901040602, 13910097637 银行汇款户名: 北京市京华行科贸有限责任公司 开户行: 北京建行玉泉路分理处 帐号: 2630017010