文章编号:1000-5404(2008)18-1743-03

论著

大黄酸-雌酮对骺板 TGF-β1 及其受体 TβR Ⅱ 蛋白表达的影响

李灵芝[1],倪 宁[1],张 丽[1],张永亮[2],龚海英[1] (武警医学院:[1]药物化学教研室;[2]科研部,天津 300162)

摘 要:目的 考察新型雌激素衍生物——大黄酸-雌酮对小鼠长骨转化生长因子-β1(TGF-β1)及其受体 TβR Ⅱ 蛋白表达的影响,初步探讨该化合物对骨的作用机制。**方法** 取16 d胚胎小鼠前肢尺骨在BGJb培养基中培养48 h,培养基中分别含有 1×10^{-6} mol/L 大黄酸-雌酮、雌酚酮、大黄酸及雌酚酮+大黄酸混合物。采用免疫组织化学方法测定长骨骺板静止区、增殖区和肥大区 TGF-β1 和 TβR Ⅱ 基因表达产物。**结果** 与空白对照组相比,雌酚酮组、大黄酸-雌酮和雌酚酮+大黄酸混合组骺板各区 TGF-β1 和 TβR Ⅱ 蛋白水平明显上调。大黄酸组仅肥大区 TβR Ⅱ 上调,其他各区 TGF-β1 和 TβR Ⅱ 蛋白水平均无明显改变。与雌酚酮组相比,大黄酸-雌酮组静止区和增殖区 TGF-β1 和 TβR Ⅱ 的表达均增强。**结论** 培养基中加入大黄酸-雌酮可上调长骨 TGF-β1 及其受体的表达,并可能与其促进体外培养胚胎小鼠长骨生长有关。

关键词: 雌酚酮; 大黄酸; 长骨;培养;转化生长因子-β1
中图法分类号: R322.71;R329.25;R977.12 **文献标识码:** A

Effects of rhein-estrone on expression of TGF-β1 and its receptor Ⅱ in epiphyseal plate

LI Ling-zhi[1], NI Ning[1], ZHANG Li[1], ZHANG Yong-liang[2], GONG Hai-ying[1] ([1]Department of Medicinal Chemistry, [2]Department of Science Research, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

Abstract: Objective To study the effect of rhein-estrone, a hybrid compound of estrone and rehein, on expressions of TGF-β1 and its receptor Ⅱ (TβR Ⅱ) in the long bones of fetal mice *in vitro* for postulating the mechanism by which rhein-estrone exerts its effect on bone. Methods The fetuses of pregnant mice were removed on day 16 of gestation, then the long bones of the forelimbs of female fetal mice were freed of muscle and soft tissues and cultured in a specifically manufactured device for 48 h in BGJb medium treated, respectively with 1×10^{-6} mol/L rhein-estrone, estrone, rhein and the mixture of estrone and rhein in the final medium. After cultured for 48 h, the long bones were harvested and immunohistochemical analysis was performed for determination of TGF-β1 and TβR Ⅱ proteins expression in epiphyseal plates. The number and their area of positive cells in the resting zone, the proliferative zone and the hypertrophic zone in epiphyseal plate were determined under image analytic system. Results When compared with the control group, the levels of TGF-β1 and TβR Ⅱ proteins were significantly up-regulated after treated respectively with 1×10^{-6} mol/L rhein-estrone, estrone or the complex of estrone and rhein, but no obvious up-regulation in both proteins were observed in each zone except TβR Ⅱ protein in the hypertrophic zone after treated with 1×10^{-6} mol/L rhein. When compared with the estrone group, the expression of TGF-β1 and TβR Ⅱ proteins in rhein-estrone group were enhanced in the resting zone and the proliferation zone. Conclusion The expressions of TGF-β1 and its receptor can be up-regulated by rhein-estrone and the up-regulated expressions may be related to promoting fetal mouse long bone growth *in vitro*.

Key words: estrone; rhein; long bone; culture; TGF-β1

大黄酸-雌酮(3-羟基-雌甾-1,3,5(10)-三烯-17酮-3-[N^4-(1,8-二羟基-9,10-蒽酮-3-甲酰基)哌嗪基-N^1-乙基]醚)是雌酚酮经哌嗪乙基桥链与大黄酸相连所得的新型雌激素衍生物,旨在利用大黄酸与骨羟磷灰石的强亲和能力,将雌酚酮选择性地转运至骨组织,降低其对乳腺、子宫的副作用。研究表明该化合物像

基金项目:天津市自然科学基金(033609811)
Supported by the Natural Science Foundation of Tianjin (033609811)
作者简介:李灵芝,女,内蒙古自治区巴彦淖尔盟人,博士,教授,主要从事抗骨质疏松药物方面的研究,发表论文120余篇。电话:(022)60578184, E-mail: llzhx@tom.com
收稿日期:2007-10-17;修回日期:2008-03-28

雌酚酮一样对长骨的生长具有促进作用,对幼雌小鼠子宫内膜却未表现出雌酚酮样的促增殖作用[1]。转化生长因子-β1(TGF-β1)与骨生长发育密切相关,雌激素对骨的作用也与 TGF-β1 有关[2-4]。本研究采用胎鼠长骨培养模型,考察大黄酸-雌酮在体外对骺板 TGF-β1 和 TβRⅡ蛋白表达的影响,初步探讨该化合物对骨组织的作用机制,为开发抗骨质疏松新药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药品及主要试剂

大黄酸-雌酮由本室自行合成。雌酚酮购自浙江仙居制药厂。兔抗小鼠 TGF-β1、TβRⅡ多克隆抗体(一抗)购自美国 Sigma 公司;兔 S-P 试剂盒(含生物素化羊抗兔 IgG,二抗)购自美国 Zymed 公司。二氨基联苯胺盐酸盐(DAB)购自北京中杉金桥生物公司。胃蛋白酶、胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司。胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)购自中国医学科学院血液学研究所。

1.2 主要仪器及设备

HG303-5A 型隔水式恒温培养箱(南京);SZ-ST 型 Olympus 解剖显微镜(日本);RM2135 型 Leica 组织切片机(德国);E800 型 Nikon 多功能显微镜带 Nikon FDX-35 相机(日本);BioMias 图像分析处理系统(四川大学图像研究所)。

1.3 长骨培养

采用文献[5]的方法,取孕龄 16 d 的雌性昆明种胎鼠,解剖显微镜下剥取前肢尺骨,置于盛有 BGJb 培养基的培养瓶中。实验分为空白对照组、1×10^{-6} mol/L 雌酚酮组、1×10^{-6} mol/L 大黄酸组、1×10^{-6} mol/L 大黄酸-雌酮组和 1×10^{-6} mol/L 大黄酸 + 1×10^{-6} mol/L 雌酚酮组,每组培养长骨 10 根。按实验分组加入待测药物,置旋转装置上,通入比例为 O_2∶CO_2∶N_2(45%∶5%∶50%)的混合气体,于(37.5±0.5)℃ 旋转培养,转速 35 r/min,24 h 后补充气体 1 次。

1.4 TGF-β1 和 TβRⅡ蛋白免疫组织化学染色

1.4.1 骨组织固定与处理 将培养 48 h 的骨组织在 40 g/L 多聚甲醛磷酸缓冲液(pH 7.2)中固定后,于 EDTA 磷酸缓冲液(pH 7.2,4 ℃)脱钙 16 d,双蒸水漂洗,石蜡包埋、自中心纵切成 5 μm 厚切片,裱于涂有明胶的载玻片上,置 37 ℃烤箱 72 h。

1.4.2 染色方法 组织切片常规脱蜡入水,在 H_2O_2 溶液中孵育 30 min,加胃蛋白酶 37 ℃反应 15 min,加新配 BSA 37 ℃封闭 30 min,S-P 染色法染色(一抗和二抗工作浓度均为 1∶200),DAB 显色,逐级乙醇脱水,二甲苯透明,封片。

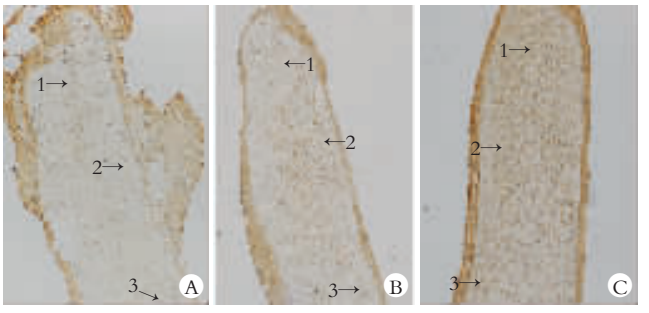
1.4.3 结果判定及图像分析 免疫组织化学染色,以胞核染成棕黄色为阳性。阴性对照用 PBS 替代一抗。每张切片 400 倍视野下随机选择测量窗面积为 414 720 μm^2,计数各组骺板静止区、增殖区、肥大区 TGF-β1、TβRⅡ阳性细胞数,并在 BioMias图像分析处理系统下测定其阳性细胞面积。

1.5 统计学方法

结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析和组间 q 检验。

2 结果

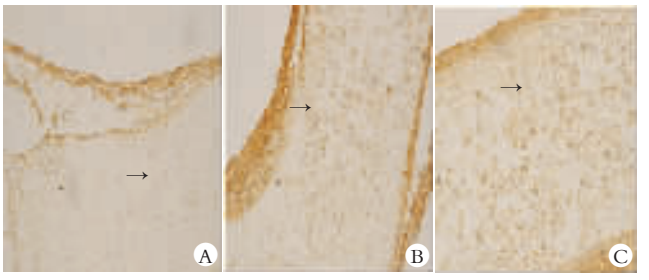
空白对照组免疫组织化学染色切片中,可见长骨骺板各区均有 TGF-β1 蛋白免疫反应阳性的软骨细胞,阳性物质位于细胞核或细胞膜,呈棕黄色。而 TβRⅡ蛋白仅在静止区和增殖区有较弱表达,肥大区几乎不表达。分别经 1×10^{-6} mol/L 雌酚酮、大黄酸-雌酮或 1×10^{-6} mol/L 大黄酸 + 1×10^{-6} mol/L 雌酚酮混合物处理后,与空白对照组相比,各组 TGF-β1 和 TβRⅡ的表达均增强,骺板各区阳性细胞数和阳性细胞面积均与空白对照组有统计学差异($P<0.01$)。与空白对照组相比,大黄酸组仅肥大区 TβRⅡ阳性细胞数和阳性细胞面积有统计学差异($P<0.01$),该区 TGF-β1 并无明显变化,静止区和增殖区 TGF-β1 和 TβRⅡ的表达虽有所增强,但无统计学意义($P>0.05$)。与雌酚酮组相比,大黄酸-雌酮组静止区和增殖区 TGF-β1 和 TβRⅡ的表达均增强,阳性细胞数及阳性细胞面积均有统计学差异($P<0.05$)(图 1、2,表 1~4)。



1:静止区;2:增殖区;3:肥大区

A:对照组各区均有 TGF-β1 表达;B:雌酚酮组各区 TGF-β1 表达增强;C:大黄酸-雌酮组各区 TGF-β1 表达增强

图 1 各组 TGF-β1 蛋白的表达 (S-P×100)



A:空白对照组 TβRⅡ表达微弱;B:雌酚酮组 TβRⅡ表达增强;C:大黄酸-雌酮组 TβRⅡ表达增强 ↑:免疫反应阳性细胞

图 2 各组增殖区 TβRⅡ蛋白的表达 (S-P×200)

表 1 各组骺板各区 TGF-β1 蛋白免疫反应阳性细胞数的变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量(mol/L)	静止区(个)	增殖区(个)	肥大区(个)
空白对照组	-	13.0±2.5	9.1±1.6	11.1±1.1
雌酚酮	1×10^{-6}	79.4±7.2[a]	56.3±6.2[a]	35.9±7.1[a]
大黄酸	1×10^{-6}	19.1±2.5	18.1±5.3	12.5±2.1
雌酚酮+大黄酸	1×10^{-6}	86.9±4.2[a]	69.5±5.9[a]	38.8±5.3[a]
大黄酸-雌酮	1×10^{-6}	92.1±10.2[ab]	69.6±7.5[ab]	46.5±4.2[a]

a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与雌酚酮组比较

表 2　各组骺板各区 TGF-β1 蛋白免疫反应阳性细胞面积的变化
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 (mol/L)	静止区 (μm^2)	增殖区 (μm^2)	肥大区 (μm^2)
空白对照组	–	390.4 ± 24.3	470.7 ± 30.3	302.3 ± 51.1
雌酚酮	1×10^{-6}	1 793.8 ± 124.2[a]	1 384.7 ± 193.3[a]	984.2 ± 302.1[a]
大黄酸	1×10^{-6}	471.3 ± 57.6	514.2 ± 31.2	322.3 ± 194.2
雌酚酮 + 大黄酸	1×10^{-6}	1 867.2 ± 112.4[a]	1 422.9 ± 98.4[a]	1 005.3 ± 209.7[a]
大黄酸-雌酮	1×10^{-6}	2 080.3 ± 200.3[ab]	1 603.4 ± 141.3[ab]	1 104.1 ± 321.1[a]

a: $P < 0.01$,与空白对照组比较; b: $P < 0.05$, 与雌酚酮组比较

表 3　各组骺板各区 TβR Ⅱ蛋白免疫反应阳性细胞数的变化
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 (mol /L)	静止区 (个)	增殖区 (个)	肥大区 (个)
空白对照组	–	9.2 ± 2.5	8.1 ± 1.6	–
雌酚酮	1×10^{-6}	62.5 ± 7.2[a]	46.3 ± 3.2[a]	29.9 ± 7.1[a]
大黄酸	1×10^{-6}	13.1 ± 2.2	12.1 ± 5.6	9.5 ± 5.1[a]
雌酚酮 + 大黄酸	1×10^{-6}	69.9 ± 6.2[ab]	37.5 ± 4.9[a]	22.5 ± 2.3[a]
大黄酸-雌酮	1×10^{-6}	78.1 ± 11.2[ab]	59.6 ± 6.5[ab]	36.5 ± 3.2[a]

a: $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b: $P < 0.05$, 与雌酚酮组比较

表 4　各组骺板各区 TβR Ⅱ蛋白免疫反应阳性细胞面积的变化
($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 (mol/L)	静止区 (μm^2)	增殖区 (μm^2)	肥大区 (μm^2)
空白对照组	–	274.4 ± 34.3	268.7 ± 30.3	–
雌酚酮	1×10^{-6}	1 384.8 ± 154.2[a]	1 104.7 ± 203.3[a]	784.2 ± 304.1[a]
大黄酸	1×10^{-6}	401.3 ± 67.6	414.2 ± 41.2	282.3 ± 204.2[a]
雌酚酮 + 大黄酸	1×10^{-6}	1 422.2 ± 95.4[ab]	1 181.9 ± 68.4[a]	889.3 ± 109.7[a]
大黄酸-雌酮	1×10^{-6}	1 780.3 ± 190.3[ab]	1 409.4 ± 121.3[ab]	1 004.1 ± 221.1[a]

a: $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b: $P < 0.05$, 与雌酚酮组比较

3　讨论

TGF-β 是骨、软骨发育的天然诱导因子。骨、软骨细胞能分泌 TGF-βs,且有 TGF-βs 的受体。Schmid 等发现,在胚胎发育的后期可在骨、软骨以及骨钙化中心检测到 TGF-β1。Dodds 用原位杂交手段检测到人软骨内成骨过程中有 TGF-β1 mRNA 表达。本实验结果也显示,正常情况下软骨细胞内有低水平的 TGF-β1 蛋白表达。目前发现人类存在 3 种 TGF-β 受体, Ⅰ型和Ⅱ型受体都是跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体,共同启动 TGF-β 在细胞质的信号, Ⅲ型受体不直接参与信号转导,但能调节Ⅰ型受体和Ⅱ型受体的亲和力。一般认为[6],TGF-β1 在信号转导时首先与Ⅱ型受体结合形成复合体,之后Ⅰ型受体加入该复合体并被Ⅱ型受体磷酸化而激活,活化的Ⅰ型受体通过激活细胞内信使 G 蛋白,使 GTP 与膜的结合力增强,使 GTP 酶活性升高;促进 Ca^{2+} 内流和胞内 IP3 积聚;激活 PKC,从而引起细胞增殖。在该过程中,Ⅰ型和Ⅱ型受体缺一不可,尤其是Ⅱ型受体,可被看作是Ⅰ型受体的上游,显得更加重要。

文献[7,8]报道外源性雌激素可促进软骨细胞产生 TGF-β 超基因家族因子,从而促进骨形成。本实验结果证实,雌酚酮在体外能明显上调长骨骺板静止区、增殖区和肥大区 TGF-β1 及其Ⅱ型受体蛋白质表达水平,这可能是其实现促进长骨生长的作用途径之一。大黄酸-雌酮浓度为 1×10^{-6} mol/L 时,骺板静止区、增殖区 TGF-β1 及其受体蛋白表达均显著高于同浓度雌酚酮组,而等摩尔浓度的雌酚酮 + 大黄酸混合组两种蛋白在静止区和增殖区的表达则与雌酚酮组无显著性差异,表明雌酚酮与大黄酸偶联后对这两种蛋白质水平的影响显著增强。这或许可能与大黄酸的趋骨性使得骨中雌激素浓度升高所致,抑或是由于大黄酸-雌酮本身分子结构的变化改变了雌激素部分与不同雌激素受体亚型的结合能力。确切原因有待于进一步研究证实。

我们前期研究发现,大黄酸对长骨生长也具有促进作用[1],但本实验结果显示,大黄酸组 TGF-β1 及其受体蛋白表达与空白对照组相比无统计学意义。提示大黄酸促进长骨生长的机制可能不是通过骨微环境中转化生长因子 TGF-β 的介导,其作用机制尚待进一步探讨。

参考文献:

[1] 李灵芝, 崔　勇, 崔　颖, 等. 大黄酸-雌激素偶联物的合成及其药理学活性[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(1): 6 – 11.

[2] Janssens K, ten-Dijke P, Janssens S, *et al*. Transforming growth factor-beta1 to the bone[J]. Endocr Rev, 2005, 26 (6): 743 – 774.

[3] 陶树清, 潘宣超, 荣杰生, 等. 转化生长因子 β 对大鼠成骨细胞雌激素受体表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11 (3): 302 – 305.

[4] Joo S S, Won T J, Kang H C, *et al*. Isoflavones extracted from Sophorae fructus upregulate IGF-I and TGF-beta and inhibit osteoclastogenesis in rat bone marrow cells[J]. Arch Pharm Res, 2004, 27(1): 99 – 105.

[5] 李灵芝, 刘启兵, 张永亮, 等. 葛根素对小鼠长骨雌激素受体 α (ERα)表达的影响[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(20): 1743 – 1746.

[6] Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus[J]. Cell, 2003, 113(6): 685 – 700.

[7] 万　荣, 杨庆铭, 邓廉夫, 等. 雌激素对关节软骨细胞生长因子 mRNA 表达的影响[J]. 上海医学, 2005, 28(2): 104 – 106.

[8] 王鸿艳, 尹国武. 雌激素抗骨质疏松机制研究进展[J]. 医学信息, 2002, 15(10): 609, 614.

(编辑　栾　嘉)