文章编号:1000-5404(2014)23-2385-04

论著

牙本质基质蛋白1在模拟失重骨丧失中的作用

张 蓉[1],韩向龙[2],张春宝[1],史 真[3],陈 庚[1],郭慧慧[1] (710032 西安,第四军医大学口腔医院,军事口腔医学国家重点实验室[1];610041 成都,四川大学口腔疾病研究国家重点实验室[2];100210 北京,总装备部司令部黄寺门诊部[3])

[摘要] **目的** 检测模拟失重状态时牙本质基质蛋白1(dentin matrix protein 1,DMP1)和成骨抑制蛋白(sclerostin,SOST)在小鼠胫骨的表达,以及正常和DMP1基因缺失下SOST的表达,初步探讨DMP1在模拟失重下骨质丧失形成过程中的可能作用及机制。**方法** ①1个月龄B6野生型小鼠随机分为悬尾组、对照组($n=5$)。悬尾组悬吊1个月后与对照组胫骨石蜡切片进行HE及DMP1和SOST免疫组化染色,实时定量PCR检测Dmp1基因水平的表达。②2个月龄B6 Dmp1基因敲除鼠制备胫骨石蜡切片,进行SOST免疫组化染色。**结果** HE染色显示悬尾组松质骨小梁较对照组稀疏,皮质骨变薄。免疫组化实验显示悬尾鼠DMP1和SOST在骨细胞细胞质和基质中的表达较对照组增高。高倍镜下DMP1和SOST阳性细胞数悬尾组显著高于对照组($P<0.05$,$P<0.01$)。Dmp1实时定量PCR结果与免疫组化结果一致,悬尾组表达量为对照组的(2.8±0.4)倍,显著高于对照组($P<0.01$)。SOST在Dmp1基因敲除鼠骨细胞中的表达也较正常增强。**结论** DMP1在模拟失重小鼠胫骨中表达增强,提示无力学刺激这一特殊的机械信号可传递至骨细胞,导致其分泌DMP1的改变。SOST在骨形成中具有抑制作用,它在Dmp1基因敲除鼠及悬尾鼠胫骨中表达的增强提示SOST表达上调,导致骨形成减少可能是Dmp1基因敲除鼠和悬尾鼠骨质丧失的一个共同的重要因素。

[关键词] 牙本质基质蛋白1;成骨抑制蛋白;尾部悬吊;实时定量PCR
[中图法分类号] R322.71; R341; R852.22 [文献标志码] A

Role of dentin matrix protein-1 in bone loss in mice during simulated weightlessness

Zhang Rong[1], Han Xianglong[2], Zhang Chunbao[1], Shi Zhen[3], Chen Geng[1], Guo Huihui[1] ([1]State Key Laboratory of Military Stomatological Medicine, Stomatological College, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710032; [2]State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041; [3]Huangsi Clinic of General Equipment Department Headquarters, Beijing, 100210, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect the expression of dentin matrix protein 1 (DMP1) and bone formation antagonist sclerostin (SOST) in the tibia of unloaded mice, and the expression of SOST in wild type mice and DMP1 knockout mice in order to investigate the possible function and mechanism of DMP1 in bone loss process during unloading. **Methods** Five 1-month-old wild type B6 mice was suspended by tail for 1 month. Another 5 mice served as control. HE staining was used to observe the morphological changes of the tibia, immunohistochemical assay were used to detect the expression of DMP1 and SOST in the tibia, and real-time PCR was employed to test the mRNA expression of Dmp1. In addition, SOST expression was also detected in 2-month-old Dmp1 knockout (KO) mice. **Results** Pathological observation showed more sparse trabeculae and thinner cortical bone in the unloaded mice than the control. Both immunohistochemical study and real-time PCR showed that expression of DMP1 and SOST were increased in unloaded tibia compared to the control ($P<0.05$, $P<0.01$). In addition, SOST expression was also increased in Dmp1 KO mice. **Conclusion** The expression of DMP1 at both protein and mRNA levels is increased in the osteocytes of unloaded mice, indicating that osteocytes secret more DMP1 after accepting unloading signals. SOST plays inhibitory role in bone formation. The increased expression in Dmp-1 KO mice and unloading mice suggests that bone loss in unloading mice and Dmp1 KO mice may share the same mechanisms through SOST pathway.

[**Key words**] dentin matrix protein 1; sclerostin; tail-suspended; Real-time PCR

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31170898) and the General Program of Health Department of General Logistic Department of PLA (CWS11J172). Corresponding author: Zhang Rong, E-mail: zhangrong@fmmu.edu.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(31170898);全军后勤科研"十二五"计划面上项目(CWS11J172)
[通信作者] 张 蓉,E-mail:zhangrong@fmmu.edu.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1612.023.html (2014-11-06)

骨组织是一种对受力高度敏感的组织。对不同人群(运动员、长期卧床患者和宇航员)的研究结果表明,骨的组织结构和功能改建都与力学刺激密切相关[1-2]。高强度的运动可导致骨质增生,而运动减少会产生骨的丧失。随着人类对太空探索的逐步深入,较长时间(大于1个月)在太空舱工作的宇航员数量日益增加,失重状态下造成骨质的丧失并持续性加重的现象令人担忧,这也限制了人们进一步探索太空奥秘的能力。与此同时,社会的老年化趋势导致的失用性骨质疏松症(osteoporosis)已不仅是医疗问题,更是一个严重的社会问题[3]。虽然对失重和运动减少造成骨丧失的分子机制目前还未阐明,力学刺激改变骨代谢的影响可能分享相同或相似的机制。

牙本质基质蛋白1(dentin matrix protein1,DMP1)是一种胞外基质蛋白,与骨桥蛋白(osteopontin,OPN)、骨涎蛋白(bone sialoprotein,BSP)、釉基质蛋白(enamelin)、细胞外基质磷酸化糖蛋白(matrix extracellular phosphoglycoprotein,MEPE)和牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein,DSPP)共为非胶原蛋白SIBLINGs家族成员。DMP-1主要在骨和牙齿等矿化组织中表达。由于它在早期和成熟的骨细胞中高表达,人们推测,DMP1的功能与骨受力相关。研究表明,骨细胞中DMP1的表达水平与骨细胞承受机械负荷相适应[4-5]。施力增加,表达也增加。但是,DMP1在无载荷状态下表达是否也会有所改变?怎样改变?它与无载荷状态下骨丧失的关系是什么?本研究探讨了模拟失重后小鼠(悬尾鼠)胫骨骨细胞中DMP1表达的改变及其在模拟失重和Dmp1基因敲除状态下对骨形成抑制蛋白SOST表达的影响,为进一步探讨失重导致骨丧失的分子机制提供有效的参考依据。

1 材料与方法

1.1 标本取材及制备

1个月龄C57BL/6雌性小鼠10只(体质量18~21 g),随机分为2组,每组5只:悬尾组、对照组。小鼠单笼饲养。悬吊鼠采用尾部悬吊法建立模拟失重模型。尾部悬于笼顶,前肢正常接触笼底,头低位,躯干与笼底水平呈30°角,后肢自然悬空不受力,前肢着地可自然活动并进食。对照组不悬吊并自由活动。悬吊4周后,断颈处死小鼠。分离并切取胫骨,一侧胫骨4 ℃下置40 g/L多聚甲醛中固定24 h,系列酒精脱水,石蜡定向包埋,纵向5 μm切片。另一侧胫骨中段5 mm新鲜提取总RNA,并进行实时定量PCR检测。第3组为2个月龄Dmp1 KO雌性小鼠(体质量20~25 mg)4只,石蜡标本处理同上。

1.2 HE染色

石蜡切片脱蜡至水,常规HE染色。

1.3 免疫组化染色(ABC法)

石蜡切片脱蜡至水,30 mL/L H_2O_2-甲醇室温孵育30 min以消除内源性过氧化物酶活性,1 g/L胰酶37 ℃消化30 min,200 mL/L正常山羊血清室温封闭1 h,倾去血清,滴加1∶200稀释的兔抗小鼠DMP1多克隆抗体(德克萨斯州贝勒牙学院秦春林教授惠赠)或1∶200兔抗小鼠SOST多克隆抗体(R&D公司,美国),4 ℃过夜。室温复温1 h,滴加1∶200稀释的生物素标记二抗(Abcan公司,美国),37 ℃孵育1 h,最后滴加1∶100辣根酶标记复合物(Vector公司,VECTASTAIN® ABC-Peroxidase试剂盒),37 ℃孵育1 h。以上每一步骤后0.01 mol/L PBS缓冲液振洗3次,每次5 min。滴加新鲜配制的DAB显色液,镜下控制显色,甲基绿复染,二甲苯透明、封片。空白对照由正常兔血清替代一抗。

1.4 染色细胞计数

连续切片,每组切片染色3次,胫骨内侧皮质骨40倍镜下随机抽取5个视野进行阳性细胞计数,计算平均值。

1.5 实时定量RT-PCR检测Dmp1基因的表达

新鲜的实验及对照标本粉碎后按照Qiagen公司RNeasy Mini试剂盒说明书提取总RNA,电泳检测RNA电泳结果。2 μg总RNA反转录合成cDNA第1链(参照Invitrogen公司SuperScript Ⅲ First-Strand Synthesis SuperMix试剂盒说明书进行)。定量RT-PCR分析参照TaKaRa公司Brilliant1 SYBR1 Green QPCR Master Mix试剂盒说明书进行。Dmp1引物正义链:5′-TGAGGAAGACAGTGACTCTCAGGA-3′,反义链:5′-TTCTCTCACCATGTGTGCTCTGAC-3′,片段大小555 bp;GAPDH引物正义链:5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,反义链:5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′,片段大小453 bp。PCR扩增程序(95 ℃,1 min,1个循环;95 ℃,30 s,60 ℃,1 min,72 ℃,30 s,45个循环)。以GAPDH为参照对PCR结果进行标化处理。实验数据采用相对定量$2^{-\Delta\Delta Ct}$表示。

1.6 统计学分析

采用SPSS统计软件,数据以$\bar{x} \pm s$表示,两组间的对比进行Student's t检验。

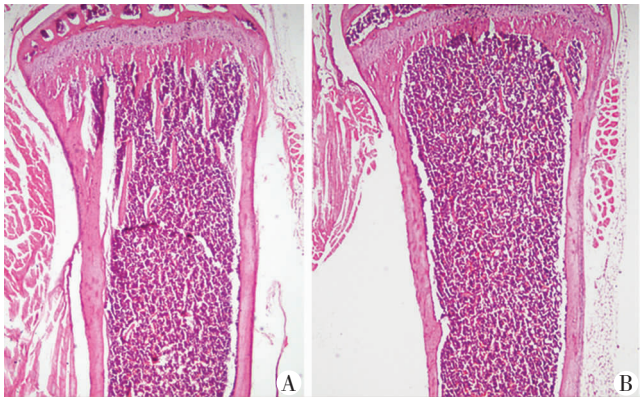
2 结果

2.1 HE染色鉴定悬尾模型的可靠性

HE染色结果显示悬尾鼠胫骨内侧骨皮质变薄,松质骨骨小梁较对照稀疏,小梁变短,数量减少(图1)。提示实验所采用的悬尾小鼠模型是可靠的。

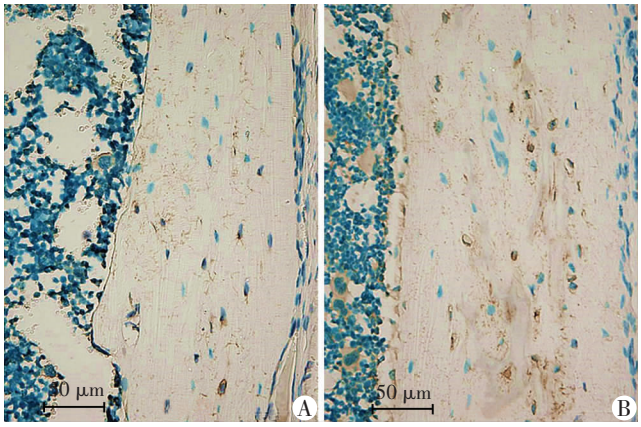
2.2 悬尾及基因敲除对DMP1及SOST蛋白表达的影响

对照组DMP1和SOST均可在胫骨骨细胞细胞质中表达(棕色着色,图2、3),DMP1在成骨细胞中也可见淡着色。悬尾组DMP1在胫骨骨细胞和成骨细胞的着色均增强,除细胞外,骨基质中也有强阳性着色(图2B)。悬尾组和Dmp1 KO组SOST在骨细胞中的着色均较对照组增强(图3B、C)。40倍镜下DMP1和SOST阳性细胞数悬尾组分别为(15.0±3.4)个、(20.0±3.6)个,显著高于对照组(10.0±1.7)个($P<0.05$)、(14.0±2.9)个($P<0.01$)。Dmp1 KO组SOST阳性细胞数为(24.0±4.9)个,也显著高于对照组($P<0.01$)。



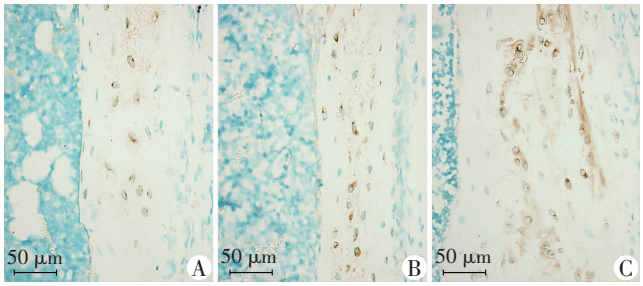
A:对照组;B:悬尾组

图 1　2 组小鼠胫骨组织 HE 染色观察结果　(×40)



A:对照组;B:悬尾组

图 2　免疫组化(ABC 法)染色检测 2 组小鼠胫骨骨细胞中 DMP-1 的表达



A:对照组;B:悬尾组;C:Dmp1 基因敲除鼠

图 3　免疫组化(ABC 法)染色检测 3 组小鼠胫骨骨细胞中 SOST 的表达

2.3　悬尾对 Dmp1 基因表达的影响

Real-time PCR 结果显示:悬尾鼠胫骨中 Dmp1 的表达量高于对照组,为对照组的(2.8 ±0.4)倍,差异有统计学意义($P<0.01$)。

3　讨论

悬尾鼠是目前用于研究模拟失重下身体机能改变和失用性骨质疏松症病因及治疗的一种成熟的动物模型[6]。本实验结果显示悬尾鼠胫骨皮质变薄,骨小梁变短,数量减少,与其他相关报道[7-8]的结果一致。说明本实验的小鼠模型是可靠的,可以在模拟失重状态下造成骨质的丧失。该模型为我们进一步对骨细胞中被检测基因的研究提供了实验基础。

骨细胞起源于成骨细胞,在成年动物,其数目占所有骨组织细胞的 90% ~95%[9]。成骨细胞的寿命是数周,而骨细胞的平均寿期大约为 25 年[10]。成熟骨细胞胞体像星形,位于骨陷窝内,包埋在矿化的细胞外骨基质中,并通过细胞突起与周围细胞相互连接,形成功能合胞体[11]。由于骨细胞包埋于矿化的骨基质之中,很难分离,因而对于它功能的研究一直是个难点。有学者们曾认为它只是一种骨组织中的占位细胞,也有的认为骨细胞可能是骨组织中机械应力的感受器,可以将机械应力转化为生化信号进行传递[12]。近年来,越来越多的研究表明,骨细胞是一种多功能的细胞,它既在维持骨骼的正常代谢中起重要作用,又可以通过传递生化信号到成骨细胞或破骨细胞,调节骨组织对机械应力做出相应的反应[13-14]。

已有的体内试验提示骨形成蛋白(bone morphogenitic proteins,BMPs),骨桥蛋白(osteopontein,OPN),前列腺素 E2(prostaglandin E2,PGE2),牙本质基质蛋白 1(DMP1)等[15-16]生化分子是参与骨细胞传递机械应力的分子。其中,DMP1 因其在骨细胞中高表达而在近年的研究中备受关注。定量研究发现,机械负荷可使骨细胞中 DMP1 表达增加 2 ~3.7 倍;本实验结果显示,DMP1 在模拟无载荷状态时,蛋白水平表达增加 1.5 倍,mRNA 水平表达增加了 2.8 倍,提示无论是增加力学刺激还是缺乏力学刺激,机械信号传递至骨细胞后 DMP1 表达的改变是一致的。那么,下游分子是怎样感知这两种施力状态的不同并传递相关信号产生不同的骨骼改变?有待于我们进一步的探讨和研究。

本研究探讨了模拟无载荷状态下 DMP1 表达的改变,并对 DMP1 在模拟失重下骨质丧失形成过程中的可能作用及机制进行了初步研究。已有的研究显示,SOST 可通过激活 Wnt/β-catenin 信号通路抑制成骨细胞的分化和分泌基质,同时可促进骨细胞自身的凋亡而抑制骨的形成[17-18]。本实验也同样对 SOST 进行了检测。发现无论是悬尾鼠还是 Dmp1 基因敲除鼠,SOST 在胫骨骨细胞中的表达均升高,提示上调骨细胞中 SOST 的表达,减少骨的形成是无载荷状态和 Dmp1 基因敲除下骨丧失[19]共同分享的机制之一。DMP1 是否还通过增加骨吸收的方式来促进无载荷状态下得骨丧失有待进一步探讨。

参考文献:

[1] Ksiezopolska-Orlowska K. Changes in bone mechanical strength in response to physical therapy[J]. Pol Arch Med Wewn, 2010, 120

(9): 368-373.
[2] Ohshima H. Secondary osteoporosis UPDATE. Bone loss due to bed rest and human space flight study[J]. Clin Calcium, 2010, 20(5): 709-716.
[3] 中国健康促进基金会骨质疏松防治中国白皮书编委会. 骨质疏松症中国白皮书[J]. 中华健康管理学杂志, 2009, 3(3): 148-154.
[4] Yang W, Kalajzic I, Lu Y, *et al*. *In vitro* and *in vivo* study on osteocyte-specific mechanical signaling pathways[J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2004, 4(4): 386-387.
[5] Harris S E, Gluhak-Heinrich J, Harris M A, *et al*. DMP1 and MEPE expression are elevated in osteocytes after mechanical loading *in vivo*: theoretical role in controlling mineral quality in the perilacunar matrix [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2007, 7(4): 313-315.
[6] Saxena R, Pan G, Dohm E D, *et al*. Modeled microgravity and hindlimb unloading sensitize osteoclast precursors to RANKL-mediated osteoclastogenesis[J]. J Bone Miner Metab, 2011, 29(1): 111-122.
[7] Lloyd S A, Lewis G S, Zhang Y, *et al*. Connexin 43 deficiency attenuates loss of trabecular bone and prevents suppression of cortical bone formation during unloading[J]. J Bone Miner Res, 2012, 27(11): 2359-2372.
[8] 付崇建, 郁冰冰, 杨连甲, 等. 尾悬吊大鼠骨和骨髓中骨钙素的变化[J]. 航天医学与医学工程, 2003, 16(4): 260-263.
[9] Parfitt A M. The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption--bone flow theory[J]. Clin Orthop Relat Res, 1977 (127): 236-247.
[10] Knothe-Tate M L, Adamson J R, Tami A E, *et al*. The osteocyte [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(1): 1-8.
[11] Knothe-Tate M L. "Whither flows the fluid?" An osteocyte's perspective[J]. J Biomech, 2003, 36(10): 1409-1424.
[12] Bonewald L F. Mechanosensation and Transduction in Osteocytes[J]. Bonekey Osteovision, 2006, 3(10): 7-15.
[13] Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, *et al*. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction [J]. Cell Metab, 2007, 5(6): 464-475.
[14] Klein-Nulend J, Bacabac R G, Bakker A D. Mechanical loading and how it affects bone cells: the role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton[J]. Eur Cell Mater, 2012, 24: 278-291.
[15] You L, Temiyasathit S, Lee P, *et al*. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading[J]. Bone, 2008, 42(1): 172-179.
[16] Wu H, Teng P N, Jayaraman T, *et al*. Dentin matrix protein 1 (DMP1) signals *via* cell surface integrin[J]. J Biol Chem, 2011, 286(34): 29462-29469.
[17] Clarke B L. Anti-sclerostin antibodies: utility in treatment of osteoporosis[J]. Maturitas, 2014, 78(3): 199-204.
[18] Ryan Z C, Craig T A, Salisbury J L, *et al*. Enhanced prostacyclin formation and Wnt signaling in sclerostin deficient osteocytes and bone [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 448(1): 83-88.
[19] Feng J Q, Ward L M, Liu S, *et al*. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism [J]. Nat Genet, 2006, 38(11): 1310-1315.

(**收稿**:2014-06-26;**修回**:2014-10-07)
(编辑 龙 亮)

(上接2384页)

2 讨论

2000年,Stoger[2]首次报道了心脏骤停的CT影像特点,即对比剂淤积在右侧身体的从属性静脉,包括静脉系统和肝右叶等。此影像特点还可以发生在急性心衰和即将发生心源性休克(impending cardiogenic shock)的患者[2-4]。后由Roth等[1]命名为"从属性静脉对比剂淤积征",一旦发生该征象,即使给予及时心肺复苏也难以挽救患者生命,一般在48 h内死亡[1,4]。

造成以上影像学特点的机制如下[2-4]:心脏骤停、急性心衰和心源性休克患者,其心脏的泵功能缺失,用于增强的注射器在注入对比剂的过程中产生推力,将未被血液稀释的对比剂反向推入下腔静脉和腹腔从属性静脉,从而导致相应的静脉系统、右侧肝脏甚至于右侧肾脏内的静脉血管显著强化。充血性心力衰竭、三尖瓣关闭不全和缩窄性心包炎的患者,在进行胸腹部增强CT检查时,也可以发现对比剂在右心、冠状窦和下腔静脉淤积的现象,但对比剂不会在腹腔静脉乃至于右肾静脉淤积,由此可以鉴别[5]。

CT检查临床常见,在患者接受检查前临床医生和CT技术员应该确保其临床状况稳定,对于生命体征等不平稳的患者,确实需要接受CT检查,CT操作人员应该与临床医生沟通,评估其耐受程度,针对那些临床状况不稳定的患者,在CT检查前、检查过程中和检查完后一段时间内,都应密切给予肉眼和心电监护检测,一旦发现从属性静脉对比剂淤积征,技术员应该立即停止操作,通知临床医师,给予及时有效的抢救措施。

参考文献:

[1] Roth C, Sneider M, Bogot N, *et al*. Dependent venous contrast pooling and layering: a sign of imminent cardiogenic shock[J]. AJR Am J Roentgenol, 2006, 186(4): 1116-1119.
[2] Stoger A, Munsterer B, Schinnerl A. Acute heart arrest in spiral CT [J]. Rofo, 2000, 172(5): 490-491.
[3] Tsai P P, Chen J H, Huang J L, *et al*. Dependent pooling: a contrast-enhanced sign of cardiac arrest during CT[J]. AJR Am J Roentgenol, 2002, 178(5): 1095-1099.
[4] Bagheri S M, Taheri M S, Pourghorban R, *et al*. Computed tomographic imaging features of sudden cardiac arrest and impending cardiogenic shock[J]. J Comput Assist Tomogr, 2012, 36(3): 291-294.
[5] Ko S F, Ng S H, Chen M C, *et al*. Sudden cardiac arrest during computed tomography examination: clinical findings and "dense abdominal veins" on computed tomography[J]. J Comput Assist Tomogr, 2003, 27(1): 93-97.

(**收稿**:2014-08-14;**修回**:2014-10-16)
(编辑 郭建秀)