

雌激素对去卵巢大鼠骨 I 型胶原表达及基质金属蛋白酶活性的影响

杨学辉* 李 恩 佟晓旭

(河北医科大学基础医学院生化教研室, 石家庄 050017)

摘要 为了探讨绝经后骨质疏松胶原代谢异常的分子机制, 采用 RT-PCR 和 Gel-SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分别检测卵巢切除大鼠骨组织 I 型胶原 mRNA 水平及基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 的活性, 免疫组化观察骨组织 I 型胶原蛋白量。卵巢切除大鼠骨组织 I 型胶原 mRNA 表达降低约 26.3%, pro-MMP-9 活性明显提高 ($P < 0.05$), 应用雌激素治疗后 I 型胶原 mRNA 表达较卵巢切除组增加 34.1%, pro-MMP-9 活性的增加明显降低。卵巢切除后骨组织 MMP-9 明胶酶活性明显提高, 应用雌激素后 MMP-9 明胶酶活性明显降低 ($P < 0.05$) 表明骨 I 型胶原 mRNA 表达减少和 pro-MMP-9 活性升高是绝经后骨质疏松的机理之一。

关键词 基质金属蛋白酶, I 型胶原 mRNA, 免疫组化, 骨质疏松

学科分类号 Q551

骨组织由 1/3 有机基质和 2/3 无机基质构成, 其中 I 型胶原蛋白占骨有机基质的 80% ~ 90%^[1,2]。I 型胶原蛋白不仅是骨骼弹性和韧性的主要构成者, 也是骨盐栖息的场所, 骨 I 型胶原的代谢状况与骨骼代谢密切相关。骨胶原的过度降解或合成减少均可引起骨弹性和韧性降低, 骨盐失去依附, 溶解增多, 极易导致骨质疏松。

实验研究已证实, 骨组织存在多种基质金属蛋白酶 (MMPs)。其中 MMP-9 主要由破骨细胞合成和分泌^[3,4], MMP-2 主要由成骨细胞合成和分泌^[5,6]。体外研究表明 MMP-2 能降解天然 I 型胶原、IV、V、VII、X、XI 胶原, 变性明胶、纤粘蛋白 (FN)、蛋白多糖等细胞外基质^[7,8]。MMP-9 主要降解 IV、V、XIII 胶原、变性明胶、整合素蛋白、蛋白多糖等^[8]。推测在骨代谢中, 首先由 MMP-2 启动骨转换, 随后在 MMP-2 及 MMP-9 的作用下水解部分降解的 I 型胶原及其他多种骨基质蛋白。因此, 测定 MMP-2 和 MMP-9 活性可作为判断骨转换的一项指标。体外研究表明, 许多因素影响成骨细胞和破骨细胞 MMPs 的表达及活性^[9]。但对体内 MMPs 活性的调节知之甚少, 雌激素缺乏极易导致骨质疏松, 骨小梁明显减少, 断裂, 提示骨有机基质合成和降解失衡。本实验采用免疫组化、RT-PCR 和 Gel-SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)

电泳检测骨组织 $\alpha_2(I)$ 胶原基因表达及骨组织 MMPs 活性的变化, 从胶原代谢方面探讨绝经后骨质疏松的分子机制及雌激素治疗的机理。

1 材料和方法

1.1 材料

各种试剂均购自北京鼎国公司: AMV 反转录酶, Random primer Kit RNasin, Taq DNA polymerase 为 Promega 公司产品, dNTPs Kit 为北京鼎国公司产品, 异硫氰酸胍为 Serva 公司产品, 琼脂糖, Gelatin 为 Sigma 公司产品。尼尔雌醇, 北京四环制药厂生产。

1.2 方法

1.2.1 动物模型和分组: 选用 6 月龄雌性 SD 大鼠 15 只, 体重 250 g 左右, 从背部进行双侧卵巢切除, 随机均分成 3 组: 假切除组 (切除卵巢同样大小脂肪, Sham 组), 卵巢切除对照组 (OVX 组), 卵巢切除+尼尔雌醇组 (OVX+E₂ 组): 于卵巢切除后第三天开始灌胃尼尔雌醇 0.06 mg/kg (成人等效剂量), 两周一次, 连续一个月。

1.2.2 骨组织基质金属蛋白酶提取及酶谱分

* 通讯联系人。

Tel: 010-6044121-5639, E-mail: yxh621@263.net

收稿日期: 2000-07-04, 接受日期: 2000-08-23

析^[10]: 断头处死动物, 分离胫骨, 去除胫骨端软骨盘和连接组织, 切下胫骨端松质骨 200 mg, 于研钵中捣碎, PBS 洗 3 次, 用 1.5 ml 10 mmol/L 三乙醇胺 (pH 7.5) 溶液匀浆后置 5 ml 塑料离心管中, 4℃ 搅拌 2 h, 10 000 r/min, 离心 10 min, 上清液转入另一个干净青霉素瓶中, -70℃ 冷冻后进行冷冻干燥, 加 200 μ l PBS 溶解冻干粉制成酶提取液, 分装-20℃ 保存备用. 考马斯亮蓝染色法进行蛋白质定量.

取酶提取液 60 μ g 进行 0.2% 明胶的 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 4℃, 80 V 电泳 3~4 h, 取出凝胶, 于 2.5% Triton X-100 溶液中洗涤 30 min, 用蒸馏水洗涤 3 次, 每次 15 min. 然后将凝胶置于 50 ml 50 mmol/L CaCl₂, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8) 溶液中保温 16 h, 蒸馏水洗涤 3 次, 考马斯亮蓝染色. 凝胶进行光密度和面积扫描.

1.2.3 骨组织总 RNA 提取及 I 型胶原 mRNA 的 RT-PCR: 分离股骨, 采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取骨组织总 RNA. 1 μ g RNA 进行随机引物逆转录反应得 cDNA, 用 α_2 (I) 胶原特异性引物进行 PCR: 正链: 5'-GTCGTCCTTCTCAGGGTAG-3', 负链: 5'-TTGTCGTAGCAGGGTTCTTT-3', 扩增产物为 254 bp. PCR 反应: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 60℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 72℃ 补平 7 min. 同时进行内对照 β -actin 的 PCR 反应, 引物正链: 5'-TCCTAGCACCATGAAGATC-3' (2 846~2 864), 负链: 5'-AAACGCAGCTCAGTAACAG-3' (3 140~3 158), 扩增产物为 190 bp. 取 PCR 产物 10 μ l 于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外灯下照相. 胶片进行光密度和面积扫描. 计算每一样品和其内参对照的相对含量. 面积比: $S_{\alpha_2(I)}/S_{\beta\text{-actin}}$.

1.2.4 骨组织 α_2 (I) 胶原的免疫组化: 分离股骨, 于 8% EDTA 溶液中脱钙 8 周, 每周更换一次脱钙液. 常规石蜡包埋切片, 脱蜡至水, 0.4% 胃蛋白酶 37℃ 消化 90 min, 进行常规免疫组化. α_2 (I) 单抗 1:200 稀释, 羊抗鼠 IgG/HRP1:50 稀释. 0.01% H₂O₂ 的 DAB 显色液显色. 显微镜下观察并照相.

1.2.5 数据处理分析: 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行单因素方差分析.

2 结 果

2.1 MMPs 活性

如图 1 和表 1 所示: Gel-SDS-PAGE 电泳, 在 66 ku 处有一条透明条带为 MMP-2, 92 ku 和 88 ku 处有两条条带分别为 pro-MMP-9 和 active-MMP-9. MMP-2 活性和 active-MMP-9 在各组之间无明显差异, Pro-MMP-9 各组之间变化较大, 卵巢切除后 Pro-MMP-9 活性明显升高 ($P < 0.05$), 经雌二醇治疗后明显降低 ($P < 0.05$).

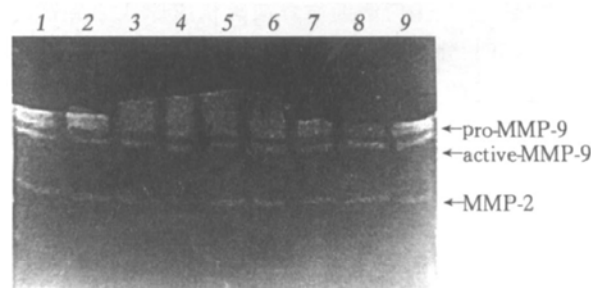


Fig. 1 Gelatin gel zymogram of electrophoresed experiment rat cancellous bone tissue extracts

1, 2: Sham group (SH); 3, 4, 5, 6: ovariectomized group (OVX); 7, 8, 9: ovariectomized+ estrogen group (OVX+ E₂).

Table 1 Gelatin gel zymogram of electrophoresed experimental rat cancellous bone tissue extracts

Area of strip/mm ²	SH	OVX	OVX+ E ₂
S _{MMP-2}	10.5 ± 0.3	11.2 ± 0.2	10.1 ± 0.3
S _{MMP-9}	23.4 ± 0.9 ¹⁾	38.5 ± 2.5	25.1 ± 0.7 ¹⁾
S _{Pro-MMP-9}	12.6 ± 0.4	13.0 ± 0.7	12.9 ± 1.6

¹⁾ indication $P < 0.05$ compared by OVX.

2.2 骨组织 α_2 (I) 胶原 mRNA 转录水平

如表 2 及图 2 所示: 卵巢切除后 I 型胶原 mRNA 水平下降 26.3%, 经雌二醇治疗后提高 34.1%.

Table 2 The levels of α_2 (I) collagen mRNA

	SH	OVX	OVX+ E ₂
$S_{\alpha_2(I)}/S_{\beta\text{-actin}}$	1.71 ± 0.47	1.26 ± 0.28	1.69 ± 0.02
Percentage vs OVX group	35.7% ¹⁾		34.1% ¹⁾
Percentage vs SH group		-26.3%	

¹⁾ indication $P < 0.05$ compared by OVX.

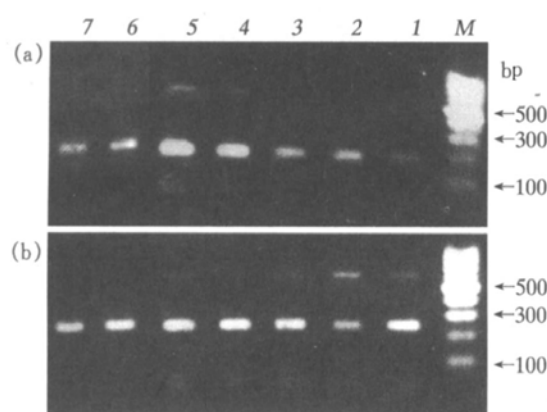


Fig. 2 The result of PCR of $\alpha_2(I)$ collagen and β -actin of bone tissues in each group rats

(a) β -actin; (b) type I collagen. 1, 2: Sham group (SH); 3, 4, 5: ovariectomized group (OVX); 6, 7: ovariectomized + estrogen (OVX+ E_2); M: molecule mass marker.

2.3 骨组织 $\alpha_2(I)$ 胶原的免疫组化

脱钙骨切片经免疫组化染色, 显微镜下可见骨小梁染色均一, 骨髓腔未见染色, 各组之间骨小梁染色程度无区别。假切除组骨小梁较多、完整、排列整齐, 卵巢切除组骨小梁断裂、稀疏, 经雌激素治疗后骨小梁明显增多。

3 讨 论

雌激素缺乏是绝经后骨质疏松发病的重要因素, 其诱导骨质疏松的机制有直接的, 也有间接的, 如导致破骨细胞生成增多、活性增强, 成骨细胞凋亡增多及骨微环境中产生多种骨吸收因子包括 IL-1, IL-6, TNF 等, 但无论通过那一种环节最终都与骨组织中胶原的代谢有关, 本研究从骨组织的基本点——胶原入手, 观察卵巢切除后骨胶原 mRNA 合成及基质金属蛋白酶活性的变化。

3.1 雌激素对 MMPs 活性的影响

基质金属蛋白酶是一类能水解多种细胞基质的 Zn^{2+} 依赖性蛋白酶, 通常以酶原的形式合成和分泌, 经不同途径激活后参与细胞外基质的降解, 与细胞增殖、迁移、组织分解和重建等有关。破骨细胞合成分泌多种蛋白酶, 尤其是基质金属蛋白酶 MMP-9 对骨有机基质的降解起重要作用, 本实验中卵巢切除后 pro-MMP-9 活性明显提高, 应用雌激素治疗后 pro-MMP-9 活性明显降低, 推测绝经后 MMP-9 活性升高, 过度降解骨有机基质, 对绝经后骨质疏松症的形成有重要作用。但许多研究表明, MMP-9 不能降解天然螺旋结构的 I 型胶原,

因而在骨吸收启动中作用不大, 而由成骨细胞合成分泌的 MMP-2 却能降解天然螺旋结构的 I 型胶原^[7]。目前实验研究发现, MMP-2 是分布最广的 MMP, 其启动子元件与其他 MMPs 不同, 具有构成性表达的特点, 认为 MMP-2 是一种看家基因^[11], 主要作用可能是降解损伤或变性胶原以保护机体。本实验结果 MMP-2 活性在各实验组之间无显著差异, 也支持这一观点。卵巢切除后 MMP-9 活性的明显升高, 导致在 MMP-2 启动骨吸收后, 骨胶原大量降解, 引起骨有机基质的大量丢失, 随之, 骨盐因失去依附而丢失, 发生骨质疏松症。

3.2 雌激素对骨 I 型胶原 mRNA 合成的影响

本实验结果, 卵巢切除后骨 $\alpha_2(I)$ 胶原 mRNA 水平明显降低, 雌激素治疗后 $\alpha_2(I)$ 胶原 mRNA 水平明显升高, 表明雌激素具有促进 I 型胶原基因表达的作用。I 型胶原是构成骨骼有机基质的主要成分, 维持骨组织的完整和强度, I 型胶原合成增多有利于骨形成。

上述结果表明卵巢切除后雌激素水平降低, 不仅影响 I 型胶原基因的转录, 同时提高基质金属蛋白酶活性, 增加 I 型胶原蛋白的降解, 导致骨胶原大量丢失, 骨盐失去依附, 骨脆性增加为特征的骨质疏松症。骨组织免疫组化结果也证实这一点。

参 考 文 献

- 1 Oxlund H, Mosekilde L, Ottorf G. Reduced concentration of collagen reducible cross links in human trabecular bone with respect to age and osteoporosis. *Bone*, 1996, **19** (5): 479~ 484
- 2 Garnero P, Sornay-rendu E, Hapuy M C, *et al.* Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 1996, **11** (3): 337~ 349
- 3 Hembry R M, Bagga M R, Reynolds J T, *et al.* Stromelysin, gelatinase A and TIMP-1 in prosthetic interface tissue: A role for macrophages in tissue remodeling. *Histopathology*, 1995, **27** (2): 149~ 159
- 4 Wucherpfennig A L, Ping Li Y, Stetler-Stevenson W G, *et al.* Expression of 92 kD Type IV collagenase in human osteoclast. *J Bone Miner Res*, 1994, **9** (4): 549~ 556
- 5 Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, *et al.* Expression of 92 kD type IV collagenase in the osteoblast lineage during mouse development. *J Cell Biol*, 1994, **124** (6): 1091~ 1102
- 6 Breckon J J, Hembry R, Reynolds J J, *et al.* Matrix metalloproteinase and TIMP-1 localization at sites of osteogenesis in the craniofacial region of the rabbit embryo. *Anat Rec*, 1995, **242** (2): 177~ 187
- 7 Armes R T, Quigley J P. Matrix metalloproteinase 2 is an interstitial collagenase: type I collagen generating the specific 3/4 and 1/4 length fragments. *J Biol Chem*, 1995, **270** (11): 5872 ~ 5876

- 8 Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinase. *J Biol Chem*, 1997, **378** (3~4): 151~160
- 9 Mauriel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem*, 1993, **53** (4): 288~295
- 10 Mansell J P, Tarlton J F, Bailey A J. Expression of gelatinases within the trabecular bone compartment of ovariectomized and parathyroidectomized adult female rats. *Bone*, 1997, **20** (6): 533~538
- 11 Ries C, Petrides P E. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *J Biol Chem*, 1995, **376** (6): 345~355

The Effects of Estrogen on Type I Collagen Expression and the Metalloproteinases Activities in Ovariectomized Rats Bone Tissue

YANG Xue-Hui*, LI En, TONG Xiao-Xu

(Department of Biochemistry, The School of Basic Medical Sciences, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract To Investigate the mechanism of postmenopausal osteoporosis in the metabolism of bone organic matrix, the levels of type I collagen mRNA in ovariectomized rats bone tissue were detected by RT-PCR. The activities of bone metalloproteinases (MMPs) were determined by Gel-SDS-PAGE. The amounts of type I collagen in bone tissues were estimated by immunohistochemistry. The expression levels of type I collagen mRNA decreased about 26.3%, and the activities of pro-MMP-9 increased markedly in ovariectomized group compared with Sham group. Estrogen increased the levels of type I collagen mRNA about 34.1% and obviously reduced the pro-MMP-9 activities compared with OVX group. Ovariectomizing in rats resulted in the decrease of type I collagen mRNA expression and the increase of pro-MMP-9 activity, both contributed to the decrease of bone organic matrix and ovariectomized osteoporosis.

Key words metalloproteins, type I collagen mRNA, immunohistochemistry, osteoporosis

* Corresponding author. Tel: 86-10-6044121-5639, E-mail: yxh621@263.net

Received: July 4, 2000 Accepted: August 23, 2000