

# 去卵巢骨质疏松大鼠成骨细胞G<sub>1</sub>期调节蛋白的改变\*\*\*\*☆

吴银生<sup>1</sup>, 林燕萍<sup>1</sup>, 卢天祥<sup>2</sup>, 林煜<sup>1</sup>, 黄云梅<sup>3</sup>, 黄美雅<sup>3</sup>

## Changes in G<sub>1</sub> phase regulatory protein of osteoblasts in ovariectomized osteoporosis rats

Wu Yin-sheng<sup>1</sup>, Lin Yan-ping<sup>1</sup>, Lu Tian-xiang<sup>2</sup>, Lin Yu<sup>1</sup>, Huang Yun-mei<sup>3</sup>, Huang Mei-ya<sup>3</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** G<sub>1</sub> phase regulatory protein plays an important role in regulating cell reproductive cycle. However, there are few reports concerning research of G<sub>1</sub> phase regulatory protein of osteoblasts, and the relationship between postmenopausal osteoporosis and the G<sub>1</sub> phase regulatory protein of osteoblasts have not been explained.

**OBJECTIVE:** To observe the change of G<sub>1</sub> phase regulatory protein of osteoblasts in the ovariectomized osteoporosis rats, and to investigate the pathogenesis of postmenopausal osteoporosis.

**METHODS:** Totally 100 6-month-old SD female rats were randomly divided into sham surgery and model groups, with 50 animals in each group. Rats in the model group were performed bilaterally ovariectomy, those in the sham surgery group were subjected to sham surgery. Ten rats of each group were sacrificed at 4, 8, 12, 18 and 24 weeks after operation, respectively. The expression of Cyclin D1, CDK4, and p21 protein in osteoblasts of lumbar vertebra were measured by immunohistochemistry.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Cyclin D1 and CDK4-positive expression mainly located at osteoblasts which in the superficies of bone trabecula. There was Cyclin D1 and CDK4 positive expression in the sham surgery group, but was obviously smaller than that of the model group. The location of p21 positive expression was similar to Cyclin D1. Obviously positive expression of p21 appeared in the bone tissue of both groups, in which that of the model group maintained at a high level, and higher than that of the sham surgery group at different periods after operation ( $P < 0.01$ ). The results demonstrated that Cyclin D1, CDK4 and p21 in osteoblasts were hyper-expressed in the process of osteoporosis in ovariectomized rats. It suggested that faster osteoblast proliferation and inhibited osteoblast cell cycles result in relative insufficiency of osteoblast, thus the bone formation is smaller than bone resorption, eventually, lead to the occurrence of osteoporosis.

Wu YS, Lin YP, Lu TX, Lin Y, Huang YM, Huang MY. Changes in G<sub>1</sub> phase regulatory protein of osteoblasts in ovariectomized osteoporosis rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(15): 2675-2679. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** G<sub>1</sub>期调节蛋白对调控增殖细胞的增殖周期具有重要作用, 目前关于成骨细胞G<sub>1</sub>期调节蛋白的研究甚少, 绝经后骨质疏松与成骨细胞G<sub>1</sub>期调节蛋白的关系更未被阐明。

**目的:** 观察去卵巢大鼠骨质疏松发病过程中成骨细胞G<sub>1</sub>期调节蛋白的改变, 探讨绝经后骨质疏松症的发病机制。

**方法:** 100只6月龄SD雌性大鼠, 随机分成假手术组和模型组各50只, 模型组进行双侧卵巢结扎切除术, 假手术组除未行卵巢结扎切除外, 其余步骤与手术组相同。所有大鼠于术后4, 8, 12, 18, 24周分批取材, 每批每组各处死10只, 取大鼠腰椎。运用免疫组织化学方法检测骨组织中成骨细胞G<sub>1</sub>期调节蛋白Cyclin D1、CDK4、p21蛋白表达。

**结果与结论:** Cyclin D1、CDK4蛋白阳性表达主要定位于骨小梁表面的成骨细胞。假手术组有Cyclin D1、CDK4蛋白阳性表达, 模型组表达强于假手术组。p21蛋白阳性表达部位与Cyclin D1相似, 假手术组和模型组均有明显阳性表达, 但模型组的表达维持在较高水平, 在各时期均明显高于同期假手术组( $P < 0.01$ )。结果证实, 去卵巢骨质疏松模型大鼠发病过程中, 成骨细胞Cyclin D1、CDK4、p21蛋白出现明显高表达。提示成骨细胞增殖加快, 同时成骨细胞周期受阻滞亦增多, 成骨细胞数量相对不足, 骨形成低于骨吸收, 导致骨质疏松的发生。

**关键词:** 绝经后骨质疏松症; 细胞周期蛋白D1; 细胞周期蛋白质依赖激酶; 癌基因蛋白质p21; 骨组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.15.004

吴银生, 林燕萍, 卢天祥, 林煜, 黄云梅, 黄美雅. 去卵巢骨质疏松大鼠成骨细胞G<sub>1</sub>期调节蛋白的改变[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(15):2675-2679. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

绝经后骨质疏松症指主要由雌激素水平下降引起的高转换型原发性骨质疏松症, 其骨吸收与骨形成均较活跃。在绝经后骨质疏松症的机制研究上, 绝经后雌激素水平降低改变成骨细胞、破骨细胞的功能、数量、寿命, 从而影响骨形成、骨吸收偶联进而导致绝经后骨质疏

松症的形成已得到证实<sup>[1]</sup>, 而成骨细胞数量的相对减少和活性的降低在此过程中扮演着重要角色。成骨细胞的数量与细胞的增殖和凋亡关系密切。

细胞增殖一次所经历的活动和所需要的时间称为细胞周期。正常的细胞周期主要分为4期: G<sub>1</sub>期(DNA合成前期)、S期(DNA合成期)、G<sub>2</sub>期(DNA合成后期)和M期(有丝分裂期), 其进程主要受到周期调节蛋白——细胞周期素(Cyclin)、

<sup>1</sup>Institute of Bone Disease, Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, Fujian Province, China; <sup>2</sup>Department of Orthopaedics, Quanzhou First Hospital, Quanzhou 362000, Fujian Province, China; <sup>3</sup>Key Laboratory of Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, Fujian Province, China

Wu Yin-sheng☆, Doctor, Assistant researcher, Institute of Bone Disease, Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, Fujian Province, China Wings197810@sina.com

Correspondence to: Lin Yan-ping, Institute of Bone Disease, Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, Fujian Province, China Lyp66@126.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30572402\*; Key Program of Social Development Department of Fujian Provincial Department of Science and Technology, No. 2009Y0028\*; Youth Talent Program of Science and Technology Department of Fujian, No. 2008F3054\*; Open Subjects of Fujian Provincial Key Laboratory of Integrative Medicine for Senile Diseases, (Fujian University of Traditional Chinese Medicine) · Chen Ke-ji Foundation for the Development of Integrative Medicine, No. 2008J1004-30, CKJ2008067\*

Received: 2009-10-03  
Accepted: 2009-12-26

<sup>1</sup> 福建中医学院中西医结合研究院骨病研究所, 福建省福州市 350108; <sup>2</sup> 福建省泉州市第一医院骨科, 福建省泉州市 362000; <sup>3</sup> 福建中医学院中西医结合研究院基础重点实验室, 福建省福州市 350108

吴银生★, 男, 1978年生, 福建省漳州市人, 汉族, 2008年福建中医学院毕业, 博士, 助理研究员, 主要从事中西医结合骨病研究。Wings197810@sina.com

通讯作者: 林燕萍, 福建中医学院中西医结合研究院骨病研究所, 福建省福州市 350108  
Lyp66@126.com

中图分类号: R318  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225 (2010)15-02675-05

收稿日期: 2009-10-03  
修回日期: 2009-12-26 (20090703008/W · Z)

细胞周期蛋白依赖激酶(Cyclin dependent kinase, CDK)和细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子(Cyclin dependent kinase inhibitor, CKI)的调控, 其中以对G<sub>1</sub>期和G<sub>1</sub>/S期检查点的调控最为重要<sup>[2]</sup>, 而在G<sub>1</sub>期和G<sub>1</sub>/S期检查点发挥直接调控作用的是Cyclin D1、CDK4、p21等G<sub>1</sub>期调节蛋白。Cyclin D1与CDK4、CDK6结合形成CDK4/6-Cyclin D1复合体推动G<sub>1</sub>期的进程。p21则可与Cyclin/CDK复合物结合, 使其激酶活性丧失, 从而使细胞周期停滞在G<sub>1</sub>期<sup>[3]</sup>。

目前对细胞周期调控的研究, 多集中于探讨肿瘤的发生机制及治疗上<sup>[4-5]</sup>, 对于成骨细胞周期素与骨质疏松的关系研究甚少, 仅少数国外学者对其部分内容进行过探讨<sup>[6-8]</sup>。因此研究绝经后骨质疏松症发病过程中成骨细胞周期蛋白的变化, 有助于阐明其发病机制。本实验意欲从G<sub>1</sub>期周期调控入手, 检测去卵巢大鼠骨质疏松发病过程中Cyclin D1、CDK4、p21的改变, 探讨成骨细胞G<sub>1</sub>期调节蛋白与实验性绝经后骨质疏松症的关系。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于2006-09/2008-05在福建省中西医结合老年性疾病重点实验室完成。

**材料:** 清洁级6月龄雌性SD大鼠100只[由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 实验动物合格证号: SCXK(沪)2003-0003, 编号: 0019151], 体质量(400±20) g。医学实验动物环境设施为福建中医学院动物实验中心鼠类实验室(合格证号: 医动字第23-016号)。实验过程中对动物处置符合2006年科学技术部发布的关于善待实验动物的指导性意见<sup>[9]</sup>。

**试剂:**

试剂及仪器	来源
即用型兔抗大鼠 Cyclin D1 多克隆抗体, CDK4 多克隆抗体	SANTA CRUZ 公司
小鼠抗大鼠 p21 多克隆抗体	武汉博士德生物技术有限公司
SABC 试剂盒	福州迈新生物技术有限公司
DAB 显色试剂盒	福州迈新生物技术有限公司

**实验方法:**

**实验动物分组、造模与取材:** 100只6月龄雌性

SD大鼠随机分成模型组(腹部切口, 双侧卵巢完全结扎切除<sup>[10-11]</sup>)和假手术组(腹部切口, 但不切除卵巢)各50只。术后4, 8, 12, 18, 24周分批取材, 每批每组各取10只大鼠。处死动物后, 迅速摘取第3腰椎, 剔除椎体周围软组织, 40 g/L甲醛固定待测。

**观察指标及检测方法:**

骨组织成骨细胞Cyclin D1、CDK4、p21蛋白免疫组织化学检测: 取下的L<sub>3</sub>标本用40 g/L甲醛固定, 10% EDTA/PBS (pH7.4)溶液脱钙后, 常规石蜡包埋切片, 采用免疫组织化学SABC法检测成骨细胞Cyclin D1、CDK4、p21等G<sub>1</sub>期调节蛋白的表达。以0.01 mol/L PBS液 (pH 7.4) 代替一抗作为每次染色的阴性对照, 具体实验步骤按说明书。

**结果判断标准:** 显微镜下观察, 以细胞核内出现明确的棕黄色颗粒为阳性细胞, 每张切片随机选取5个视野, 计数每个视野成骨细胞中阳性细胞的比例, 然后计算5个视野的平均百分数, 根据阳性细胞百分率判断结果<sup>[12]</sup>。

**主要观察指标:** ①Cyclin D1蛋白的表达。②CDK4蛋白的表达。③p21蛋白的表达。

**设计、实施、评估者:** 实验的设计、评估由第一、第二作者共同完成, 实施由全体作者共同完成, 所有作者均受过动物实验培训。

**统计学分析:** 由第一作者运用SPSS 13.0软件包处理分析, 参数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据比较采用单向方差分析,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 实验动物数量分析** 实验选用SD大鼠100只, 分为2组, 无脱失, 全部进入结果分析。

**2.2 各组大鼠骨组织成骨细胞Cyclin D1蛋白的表达** 免疫组织化学检测结果显示, Cyclin D1蛋白阳性细胞表达主要定位于骨小梁间隙的间充质细胞以及骨小梁表面的成骨细胞, 表达部位主要在细胞核, 见图1。

假手术组大鼠腰椎椎体骨小梁表面成骨细胞有散在Cyclin D1蛋白弱阳性表达, 模型组在行卵巢切除术后, Cyclin D1蛋白表达明显增加, 染色加深。术后模型组Cyclin D1蛋白表达强于假手术组, 其中术后12, 18, 24周与同期假手术组相比差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。见表1。

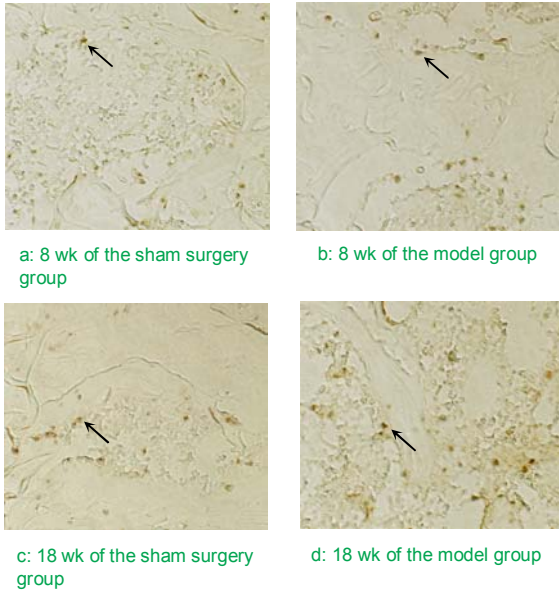


Figure 1 Expression of Cyclin D1 protein in bone trabecula of 2 groups (Arrow notes positive cells, DAB coloration, ×200)  
图 1 两组大鼠骨小梁 Cyclin D1 蛋白的表达(免疫组织化学染色 DAB 显色, 箭头指阳性细胞, ×200)

表 1 各组不同时期 Cyclin D1 蛋白表达检测结果  
Table 1 Expression of Cyclin D1 protein at different time points (x±s, %)

Group	4 wk	8 wk	12 wk
Sham surgery	10.67±1.63	12.06±1.74	11.67±1.80
Model	12.06±1.73	12.83±1.47	13.75±1.21 <sup>a</sup>
Group	18 wk	24 wk	
Sham surgery	12.10±1.50	12.27±0.97	
Model	13.67±1.73 <sup>a</sup>	14.71±0.79 <sup>a</sup>	

<sup>a</sup>P < 0.05, vs. sham surgery group

2.3 两组大鼠骨组织成骨细胞 CDK4 蛋白的表达  
CDK4 蛋白阳性表达部位与 Cyclin D1 一致, 主要定位于骨小梁间隙的间充质细胞以及骨小梁表面的成骨细胞, 见图 2。

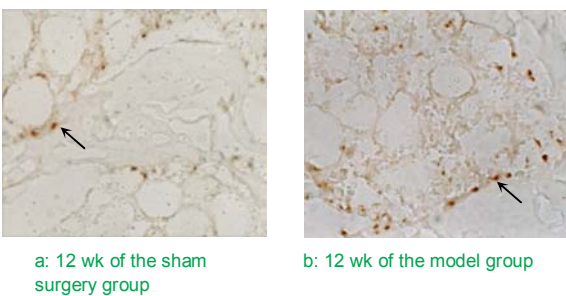


Figure 2 Expression of CDK4 protein in 2 groups (Arrow notes positive cells, immunohistochemistry staining, ×200)  
图 2 两组大鼠骨小梁 CDK4 蛋白的表达(免疫组织化学染色, 箭头指阳性细胞, ×200)

假手术组大鼠腰椎椎体骨小梁表面成骨细胞有明显 CDK4 蛋白表达, 模型组 CDK 蛋白表达强于假手术组, 其中术后 12, 18, 24 周与同期假手术组相比差异有显著性意义 (P < 0.05)。见表 2。

表 2 各组不同时期 CDK4 蛋白表达检测结果  
Table 2 Expression of CDK4 protein at different time points (x±s, %)

Group	4 wk	8 wk	12 wk
Sham surgery	19.84±1.95	19.62±0.69	19.73±1.10
Model	21.36±0.81	21.17±1.32	22.09±1.87 <sup>a</sup>
Group	18 wk	24 wk	
Sham surgery	18.82±1.22	18.65±1.25	
Model	21.46±1.02 <sup>a</sup>	21.11±1.37 <sup>a</sup>	

<sup>a</sup>P < 0.05, vs. sham surgery group

2.4 两组大鼠骨组织成骨细胞 p21 蛋白的表达 与 Cyclin D1 相似, p21 蛋白阳性表达亦定位于骨小梁间隙的间充质细胞以及骨小梁表面的成骨细胞, 见图 3。假手术组大鼠腰椎椎体骨小梁表面成骨细胞细胞有明显 p21 蛋白表达, 模型组表达明显高于假手术组, 术后 4、8、12、18、24 周均明显高于假手术组 (P < 0.01)。见表 3。

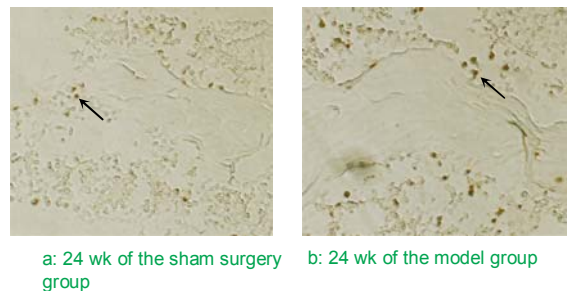


Figure 3 Expression of p21 protein in 2 groups (Arrow notes positive cells, immunohistochemistry staining, ×200)  
图 3 两组大鼠骨小梁 p21 蛋白的表达(免疫组织化学染色, 箭头指阳性细胞, ×200)

表 3 各组大鼠不同时期 p21 蛋白表达检测结果  
Table 3 Expression of p21 protein at different time points (x±s, %)

Group	4 wk	8 wk	12 wk
Sham surgery	12.26±1.17	12.27±2.01	11.91±1.35
Model	18.34±1.97 <sup>a</sup>	21.17±1.32 <sup>a</sup>	19.28±1.94 <sup>a</sup>
Group	18 wk	24 wk	
Sham surgery	10.77±1.87	10.00±2.62	
Model	22.81±2.32 <sup>a</sup>	23.95±2.26 <sup>a</sup>	

<sup>a</sup>P < 0.01, vs. sham surgery group

### 3 讨论

3.1 G<sub>1</sub> 期调节蛋白与细胞增殖 近年来对细胞周期的

研究取得了突破性进展,发现并确立了Cyclin、CDK和CKI的调控机制。细胞周期的运行与否,能否按序完成上述众多的细胞周期时相,受控于精密的细胞周期调控机制。细胞周期调控机制的核心是CDK-Cyclin系统,即依赖于Cyclin的周期特异性的表达、累积与分解和CDK的时相性激活。

细胞周期从G<sub>1</sub>期到M期存在多个检查点<sup>[13]</sup>,这些检查点保证在细胞周期的某一特定时相发生的关键事件按时有序地完成,避免遗传异常的细胞形成。在遇到细胞内外特殊状态时,细胞周期的进程能在这些检查点处被阻滞<sup>[14]</sup>。许多凋亡的刺激信号在细胞凋亡前诱发细胞周期在检查点处停滞,因此这些信号在影响细胞凋亡机制的同时也影响了细胞周期的机制。检查点正是通过细胞周期停滞来决定是完成分裂,还是停止生长,抑或启动凋亡机制<sup>[15]</sup>。在这些检查点中,G<sub>1</sub>/S检查点(DNA合成起始转换点)最为重要<sup>[16]</sup>,在这一转换点之前或与此同时,细胞要做出是停留于G<sub>0</sub>期还是继续进入另一轮分裂的抉择<sup>[2]</sup>。细胞周期能否顺利通过G<sub>1</sub>/S检查点,与G<sub>1</sub>期调节蛋白的调控密切相关。

Cyclin D1的合成和表达依赖于生长因子,当去除生长因子时,Cyclin D1的合成立即终止。故它被认为可能具有生长因子传感器的作用,即:把生长因子诱导的信号连接到细胞周期的调节<sup>[17]</sup>。Cyclin D1与CDK4、CDK6结合形成CDK4/6-Cyclin D1复合体推动G<sub>1</sub>期的进程。Cyclin D1是G<sub>1</sub>期细胞增殖信号的关键蛋白<sup>[17]</sup>。

p21是哺乳类动物细胞中最早了解并克隆的CKI家族成员,它是目前已知的具有最广泛激酶抑制活性的CKI,几乎可与每一种Cyclin/CDK复合物结合,使其激酶活性丧失,从而使细胞周期停滞在G<sub>1</sub>期<sup>[18]</sup>。此外,还能结合DNA复制必需因子——增殖细胞核抗原(PCNA),从而抑制DNA的复制<sup>[19]</sup>。p21的生长抑制作用可以是DNA损伤后P53过表达诱导产生,也可以是非依赖P53途径,如细胞外信号TGF-β的刺激可诱导p21的表达<sup>[20]</sup>。当发现DNA损伤或生长因子缺乏时,检查点发出信号,Cyclin D1被降解,释放出p21,阻滞细胞周期的进程,进行DNA修复,当细胞无法修复时,细胞凋亡机制将被启动,引起细胞凋亡<sup>[21]</sup>。

可见,细胞能否通过G<sub>1</sub>/S期检查点对于细胞增殖周期的推进是至关重要的,而Cyclin D1、CDK4、p21等G<sub>1</sub>期调节蛋白在这一过程中发挥着关键性的作用。

目前关于成骨细胞与细胞周期调控的关系研究甚少,仅见少数文献报道。2002年日本学者Fujita发现雌激素通过诱导Cyclin D来提高CDK4/6活性,进而促进成骨细胞的生长<sup>[6]</sup>。Smith等<sup>[7]</sup>研究发现,糖皮质激素会使Cyclin A和CDK2水平同时下降,使成骨细胞无法由G<sub>1</sub>期进入S期。2004年Michitaka等用槲皮素刺激p21的表达,使成骨细胞停滞于G<sub>1</sub>期<sup>[22]</sup>,p21是细胞周期的负调

节因子。国内学者祝颂松等<sup>[23]</sup>实验研究发现下颌骨牵张成骨过程中,牵张间隙内成骨细胞Cyclin A、Cyclin D、Cyclin E的高水平表达,血清CDK4水平升高,说明Cyclin A、Cyclin D、Cyclin E以及CDK4对成骨细胞的增殖起着重要作用。

**3.2 去卵巢骨质疏松大鼠成骨细胞G<sub>1</sub>期调节蛋白的改变** 实验结果显示,正常大鼠骨组织成骨细胞中存在着G<sub>1</sub>期正性调节因子Cyclin D1、CDK4和负性调节因子p21的稳定表达,说明成骨细胞进行着正常的增殖活动,保证一定的数量,与破骨细胞形成偶联;而去卵巢模鼠在术后不同时期的检测中,成骨细胞Cyclin D1、CDK4蛋白的阳性表达升高,其中Cyclin D1、CDK4的表达在术后12, 18, 24周与假手术组比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),提示在雌激素缺乏后,去卵巢骨质疏松模鼠松质骨内进入增殖周期的成骨细胞增多,成骨细胞增殖加快。同时去卵巢骨质疏松模鼠成骨细胞p21蛋白的高表达则更为显著,其在术后各期的表达均明显高于假手术组( $P < 0.01$ ),提示成骨细胞增殖周期受到阻滞,推测与雌激素缺乏引起成骨细胞的凋亡增多、过早减少,成骨细胞数量相对不足有关。因为p21能与CDK-Cyclin结合,抑制CDK-Cyclin的激酶活性,引起细胞G<sub>1</sub>期阻滞,G<sub>1</sub>/S期检查点将在此周期阻滞中决定细胞是否完成分裂,还是停止生长,抑或启动凋亡机制<sup>[15]</sup>。

绝经后骨质疏松症是高转换型(I型)原发性骨质疏松,即骨吸收加快的同时,骨合成代谢也加速,但骨吸收大于骨形成<sup>[24-25]</sup>。研究证实雌激素缺乏妇女,骨吸收与骨形成同时亢进<sup>[26-27]</sup>。Garnod等<sup>[27]</sup>对653名绝经后的法国妇女进行研究发现骨形成增加45%,而骨吸收的标记增加超过90%。进一步研究发现,绝经后妇女由于卵巢功能减退导致雌激素缺乏,骨吸收增加继之可反馈性引起骨形成增加,使骨转换率迅速升高<sup>[25, 28-29]</sup>。本实验结果显示,去卵巢模鼠成骨细胞Cyclin D1、CDK4蛋白的阳性表达升高,提示雌激素缺乏后,有更多成骨细胞进入增殖周期,考虑可能与雌激素缺乏后出现的反馈性骨形成增加有关。但是这种反馈机制目前并未明了,推测可能与成骨细胞和破骨细胞之间的偶联机制有关,关于这方面的确切机制有待于进一步研究。

综上所述,可以推断,实验中切除模鼠卵巢人为造成雌激素缺乏后,破坏了其对成骨细胞与破骨细胞的调控,一方面导致成骨细胞功能低下、破骨细胞功能亢进<sup>[30]</sup>,另一方面引起破骨细胞的数量增加,骨转换加快,同时成骨细胞凋亡增多、细胞数量过早减少,成骨细胞数量相对不足<sup>[31]</sup>,影响骨形成与骨吸收的偶联,导致骨质疏松发生。在此过程中,成骨细胞G<sub>1</sub>期调节蛋白Cyclin D1、CDK4的高表达,提示进入增殖周期的成骨细胞增多,成骨细胞增殖加快,这可能与雌激素缺乏后,骨吸收增加反馈性引起的骨形成增加有关,而p21

高表达, 阻滞成骨细胞增殖周期 G<sub>1</sub> 期进程, 可能与成骨细胞凋亡增加、数量相对不足有关。因此, 成骨细胞 G<sub>1</sub> 期调节蛋白通过影响成骨细胞增殖周期在绝经后骨质疏松症发病过程中发挥一定的作用。

#### 4 参考文献

- [1] Xie Z, Li ZH. Zhonghua Laonian Yixue Zazhi. 2004;23(6):436-438. 谢肇, 李起鸿. 绝经后骨质疏松症的细胞凋亡及其调控机制[J]. 中华老年医学杂志, 2004, 23(6):436-438.
- [2] Gui JF. Beijing: Science Press. 1998:79. 桂建芳. RNA 加工与细胞周期调控[M]. 北京: 科学出版社, 1998:79.
- [3] Ma XF, Du XG, Xin XL, et al. Xiandai Shengwu Yixue Jinzhan. 2009; 5(9):950-953. 马晓方, 杜晓光, 辛现良, 等. 肿瘤细胞恶性增殖和细胞周期调控改变的分子机制[J]. 现代生物医学进展, 2009, 5(9):950-953.
- [4] H Shi, S Chen, H Jin, et al. Downregulation of MSP58 inhibits growth of human colorectal cancer cells via regulation of the cyclin D1-cyclin-dependent kinase 4-p21 pathway. Cancer Science. 2009;100(9):1585-1590.
- [5] X Yu, Y Luo, Y Zhou, et al. BRCA1 overexpression sensitizes cancer cells to lovastatin via regulation of cyclin D1-CDK4-p21/WAF1/CIP1 pathway: analyses using a breast cancer cell line and tumoral xenograft model. International Journal of Oncology. 2008;33(3):555-563.
- [6] Fujita M, Urano T, Horie K, et al. Estrogen activates cyclin-dependent kinases 4 and 6 through induction of cyclin D in rat primary osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun. 2002; 299(2):222-228.
- [7] Smith E, Redman RA, Logg CR, et al. Glucocorticoids Inhibit Developmental Stage-specific Osteoblast Cell Cycle. J Biological Chemistry. 2000;275(26):19992-20001.
- [8] Li M, Zhao L, Liu J, et al. Hydrogen peroxide induces G2 cell cycle arrest and inhibits cell proliferation in osteoblasts. The Anatomical Record. 2009;292(8):1107-1113.
- [9] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [10] Duan YH, Liu J, Hu YY, et al. Zhongguo Yiyao. 2006;1(12):740-742. 段永宏, 刘建, 胡蕴玉, 等. 鹿瓜多肽注射液对去卵巢大鼠骨密度及骨质疏松中骨形态发生蛋白表达的影响[J]. 中国医药, 2006, 1(12):740-742.
- [11] Ala MS, Li S. Zhonghua Wuli Yixue yu Kangfu Zazhi. 2006;28(10):657-659. 阿拉木斯, 李爽. 运动对去卵巢大鼠腰椎抗压性能的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2006, 28(10):657-659.
- [12] Hu M, Ma YZ, Zhang CS, et al. Zhongguo Kangfu Lilun yu Shijian. 2006;12(6):484-487. 胡明, 马远征, 张传森, 等. 人退变椎间盘组织细胞凋亡相关基因表达的初步研究[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(6):484-487.
- [13] Wu JG, Jian BJ, Shiyuan Yixue Zazhi. Shiyuan Yixue Zazhi. 2007; 23(22):3487-3489. 吴巨钢, 姜波健. 细胞周期中胃癌相关基因的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2007, 23(22):3487-3489.
- [14] Lu M, Jia N, Xu K, et al. Zhongguo Fushe Weisheng. 2007;16(2):251-252. 逯敏, 贾妮, 徐凯, 等. 射线诱导细胞周期阻滞与肿瘤放射增敏的研究进展[J]. 中国辐射卫生, 2007, 16(2):251-252.
- [15] Peng LM, Wang ZL. Beijing: People's Medical Publishing House. 2000:132-133. 彭黎明, 王增礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000:132-133.
- [16] Luo Z, Lu MZ, Liu Y, et al. Zhongguo Zhongliu. 2003;12(4):220-222. 罗政, 路名芝, 刘勇, 等. 大肠癌细胞周期 G<sub>1</sub>/S 期检查点调控的研究进展[J]. 中国肿瘤, 2003, 12(4):220-222.
- [17] Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, et al. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. Cell. 1991;65:701.
- [18] Song QM, Sun DX. Yi xue Zongshu. 2008;14(6):816-818. 宋其曼, 孙洞箫. 细胞凋亡与 p21 关系的研究进展[J]. 医学综述, 2008, 14(6):816-818.
- [19] Chen J, Jackson PK, Kirschner MW, et al. Separate domains of p21 involved in the inhibition of CDK kinase and PCNA. Nature. 1995; 374:386-388.
- [20] Li XR, Lin XY, Xiao ZX, et al. 2008;14(14):2094-2097. 李向荣, 林星余, 肖忠秀, 等. p21 结构功能与研究新进展. 医学综述, 2008, 14(14):2094-2097.
- [21] Yu W, Zhang H. Jinan Daxue Xuebao: Yixueban. 2003;24(16):41-44. 余卫, 张涓. 细胞周期与细胞凋亡共同的调节分子——Survivin 蛋白[J]. 暨南大学学报: 医学版, 2003, 24(16):41-44.
- [22] Notoya M, Tsukamoto Y, Nishimura H, et al. Quercetin, a flavonoid, inhibits the proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblasts in vitro. Eur J Pharmacol. 2004;485(1-3):89-96.
- [23] Zhu SS, Hu J, Li JH, et al. Kouqing Yixue Yanjiu. 2005;21(5):498-500. 祝颂松, 胡静, 李继华, 等. 细胞周期调节蛋白在下颌牵张成骨过程中的表达及作用[J]. 口腔医学研究, 2005, 21(5):498-500.
- [24] Zhang XZ, Song LG, Li H, et al. Zhonghua Neike Zazhi. 2006;45(7):565-568. 张秀珍, 宋利格, 李红, 等. 阿伦磷酸钠对绝经后骨质疏松症患者骨密度、细胞因子及骨代谢指标的影响[J]. 中华内科杂志, 2006, 45(7):565-568.
- [25] Dai Y, Shen L. Zhongguo Guzhi Shusong Zazhi. 2007;13(4):229-233. 戴焱, 沈霖. 血清基质金属蛋白酶 2 和抑制因子与绝经后骨质疏松症的相关性[J]. 中国骨质疏松杂志, 2007, 13(4):229-233.
- [26] Guo LJ, Luo XH, Wu XP, et al. Zhonghua Yixue Zazhi. 2005;85(11):734-737. 郭丽娟, 罗湘杭, 伍贤平, 等. 绝经后妇女血清基质金属蛋白酶-1、-2 和组织金属蛋白酶抑制因子-1 及其与骨密度及骨转换生化指标的关系[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(11):734-737.
- [27] Garnod P, Sornay-Rendu E, Chapuy M, et al. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. J Bone Miner Res. 1996;11:337-349.
- [28] Gamero P, Sornay-Rendu E, Claustart B, et al. Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: the OFELY study. J Bone Miner Res. 2000;15:1526-1536.
- [29] Dai Y, Shen L. Zhonghua Meifenmi Daixie Zazhi. 2007;23(3):206-210. 戴焱, 沈霖. 绝经后妇女 MMP-2 和 TIMP-2 水平及其与骨密度和骨代谢指标的关系[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2007, 23(3):206-210.
- [30] Chen L, Xie XW, Li N, et al. Zhongguo ZG. 2002;14(3):53-54. 陈列, 谢兴文, 李宁, 等. 雌激素缺乏导致绝经后骨质疏松病理机制的研究[J]. 中医正骨, 2002, 14(3):53-54.
- [31] Zou SE, Zhang SF. Xiandai Fuchanke Jinzhan. 2006;15(7):547-549. 邹世恩, 张绍芬. 雌激素对成骨细胞和破骨细胞凋亡的调节机制[J]. 现代妇产科进展, 2006, 15(7):547-549.

#### 来自本文课题的更多信息——

**基金资助:** 课题为系列研究, 分别获得国家自然科学基金项目(30572402); 福建省科技厅社发处重点项目(2009Y0028); 福建省科技厅青年人才项目(2008F3054); 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室(福建中医学院)开放课题·陈可冀中西医结合发展基金资助项目(2008J1004-30、CKJ2008067)的资助。

**利益冲突:** 无利益冲突。

**课题的创新点:** G<sub>1</sub> 期调节蛋白对调控增殖细胞的增殖周期具有重要意义, 目前的研究多集中于探讨肿瘤的发生机制及治疗上。课题将 G<sub>1</sub> 期调节蛋白引入对成骨细胞增殖的研究中, 旨在观察绝经后骨质疏松发生过程中成骨细胞 G<sub>1</sub> 期调节蛋白的改变, 从成骨细胞增殖调控方面探讨绝经后骨质疏松的发病机制。

**课题评价的“金标准”:** 实验观察指标应该以荧光定量 PCR 等定量检测为佳, 但由于骨组织中尚存在其他影响因素, 因此选择用免疫组织化学检测阳性细胞计数进行半定量, 今后的研究拟进行体外成骨细胞培养并运用定量检测方法检测以进一步探讨相关问题。

**设计或课题的缺陷与不足:** 课题的设计仅涉及成骨细胞 G<sub>1</sub> 期调节蛋白, 未研究 G<sub>1</sub> 期调节蛋白的上游调节因素及其下游的作用底物, 即研究仅涉及到信号通路的点或面, 而未阐明整条信号通路, 因此有待进一步研究。

**提供临床借鉴的价值:** 实验为进一步探索绝经后骨质疏松症的发病机制提供线索, 为研发防治绝经后骨质疏松症的新药提供理论依据。