

雌激素和来曲唑对鸡胚额骨成骨细胞影响的差异比较**☆

邓益锋, 陈秀霞, 胡云峰, 侯加法

Effects of estrogen versus letrozole on chicken embryo frontal bone osteoblast

Deng Yi-feng, Chen Xiu-xia, Hu Yun-feng, Hou Jia-fa

Abstract

BACKGROUND: There are plenty of studies of estrogen effects on mammalian osteoblast, but the studies of estrogen effects on bird osteoblast cannot be found. There are many reports about the side effects of letrozole on bone metabolism, but there are no reports about the effect of letrozole on osteoblast.

OBJECTIVE: The effects of estrogen and letrozole on the proliferation, cell cycle, estrogen receptor mRNA expression and alkaline phosphatase (ALP) activity of chicken osteoblast in vitro were studied in order to illustrate the mechanism of medullary bone osteogenesis.

METHODS: The osteoblasts were harvested from the frontal bone of 15-day SPF chicken embryos by the enzyme digestion, and treated with various mass concentrations of estrogen (0, 5, 10, 20, 100, 200, 400, 800, 2 000, 20 000 ng/L) and letrozole (0, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1 000, 5 000 µg/L). The proliferation rates of the osteoblast treated with estrogen or letrozole were measured through the MTT method. The ALP activities of osteoblast were measured by the pNPP method. The cell cycle was measured by flow cytometry. The expression of estrogen receptor mRNA was detected using real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR).

RESULTS AND CONCLUSION: The estrogen could promote proliferation of osteoblast in concentration- and time-dependent fashion. Estrogen could increase the expression of estrogen receptor mRNA, impulse cell cycle, and elevate ALP activities. Letrozole could increase the cell population, impulse cell cycle, inhibit estrogen receptor mRNA expression, but letrozole has no effects on ALP synthesis and secretion.

Deng YF, Chen XX, Hu YF, Hou JF. Effects of estrogen versus letrozole on chicken embryo frontal bone osteoblast. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(7): 1157-1161. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 雌激素对哺乳动物成骨细胞影响研究较多, 但其对禽类成骨细胞的影响还未见报道; 来曲唑对骨代谢的不良反应报道较多, 但其对成骨细胞的影响还未见报道。

目的: 实验创新性为通过观察雌激素、来曲唑对体外培养鸡胚成骨细胞增殖、周期及雌激素受体 mRNA 表达和碱性磷酸酶活性的影响, 以阐明蛋鸡髓质骨的代谢机制。

方法: 取 15 日龄 SPF 鸡胚, 酶消化法获取鸡胚额骨成骨细胞, 分别采用不同质量浓度雌激素(0, 5, 10, 20, 100, 200, 400, 800, 2 000, 20 000 ng/L)和来曲唑(0, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1 000, 5 000 µg/L)处理。以四甲基偶氮唑盐法测定细胞增殖率, 以 pNPP 法测定碱性磷酸酶活性, 以流式细胞术测定细胞周期情况, 以用实时荧光定量 PCR 法测定雌激素受体 mRNA 的表达。

结果与结论: 雌激素可促进鸡胚成骨细胞增殖, 且具有浓度和时间依赖性, 雌激素能诱导成骨细胞雌激素受体 mRNA 表达, 推动细胞周期进程, 提高鸡胚成骨细胞碱性磷酸酶活性。来曲唑可促进成骨细胞增殖, 推动细胞周期进程, 抑制成骨细胞雌激素受体 mRNA 表达, 但来曲唑对碱性磷酸酶的合成与分泌没有明显影响。

关键词: 鸡胚; 成骨细胞; 雌激素; 来曲唑; 雌激素受体; 增殖; 碱性磷酸酶

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.07.004

邓益锋, 陈秀霞, 胡云峰, 侯加法. 雌激素和来曲唑对鸡胚额骨成骨细胞影响的差异比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(7):1157-1161. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

青年蛋鸡在性成熟前, 体内雌激素水平迅速升高, 引起髓质骨大量产生^[1]。人和大鼠体外试验表明, 雌激素不仅可以影响成骨细胞的增殖和凋亡^[2-4], 而且还影响成骨细胞功能发挥, 促进编码骨基质蛋白、激素受体、转录因子基因的表达^[5-8]。雌激素对蛋鸡成骨细胞的影响还未见报

道。文章将通过不同浓度的雌激素和抗雌激素药物——来曲唑处理体外培养的鸡胚成骨细胞, 研究其对鸡胚成骨细胞增殖、周期、雌激素受体 mRNA 表达及其碱性磷酸酶活性的影响。

1 材料和方法

设计: 体外观察实验。

时间及地点: 实验于2006-01/2008-12在

College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

Deng Yi-feng☆, Doctor, Lecturer, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China
dengyif@njau.edu.cn

Correspondence to: Hou Jia-fa, Professor, Doctoral supervisor, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China
jhou@njau.edu.cn
houjiafa@163.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30671546*; the Youth Innovation Foundation of Nanjing Agricultural University, No. KJ0716*

Received: 2009-08-17
Accepted: 2009-09-25

南京农业大学动物医学院, 江苏省南京市 210095

邓益锋☆, 男, 1974年生, 江苏省东台市人, 汉族, 2008年南京农业大学毕业, 博士, 讲师, 从事畜禽骨骼生物学和小动物外科学研究。
dengyif@njau.edu.cn

通讯作者: 侯加法, 教授, 博士生导师, 南京农业大学动物医学院, 江苏省南京市 210095
jfhou@njau.edu.cn
houjiafa@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)07-01157-05

收稿日期: 2009-07-17
修回日期: 2009-09-25
(20090717013/W · Q)

南京农业大学动物医学院畜禽骨骼生物学实验室完成。

材料:

药品及试剂	来源
15 日龄 SPF 鸡胚	南京药械厂
雌激素(17β-雌二醇)、 II 型胶原酶、胰蛋白酶	Sigma
来曲唑原粉	武汉远城科技科技发展有限公司
MTT、DMSO、PNPP	上海生物工程有限公司
细胞周期检测试剂盒	BD 公司
Trizol、dNTP、M-MLV 反转录酶	Takara
Hot Start Polymerase	Promega
Eva Green	Biotium
流式细胞仪(FACSCantoTM 型)	美国 BD 公司
酶标仪	BioTek

实验方法:

雌激素的配制: 无水乙醇配制含 20 mg/L 雌激素母液, 然后逐步稀释加入到含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 使雌激素终质量浓度为 0, 5, 10, 20, 100, 200, 400, 800, 2 000, 20 000 ng/L。

来曲唑的配制: 氯仿配制含 100 g/L 来曲唑母液, 然后逐步稀释加入到含体积分数为 10% FCS 的 DMEM 培养液中, 使来曲唑终质量浓度为 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1 000, 5 000 μg/L。

鸡胚额骨成骨细胞的培养: 参照文献[9]。

细胞增殖试验[四甲基偶氮唑盐(MTT)法]: 于 96 孔细胞板中, 每孔接种第 3 代成骨细胞 4×10^3 个, 每组 8 个重复。培养 24 h 后, 吸出培养液, 分别加入上述不同质量浓度雌激素、来曲唑培养液培养 10, 24 h 后, 吸出培养液, 并用 PBS 冲洗, 更换无血清的 DMEM 培养液, 同时加入 2 g/L MTT 30 μL, 孵育 4 h 后, 加入 DMSO 150 μL 终止反应后, 用酶标仪(BioTek)测定其 A 值, 波长 570 nm。

细胞碱性磷酸酶活性测定(PNPP法): 细胞培养和雌激素、来曲唑浓度同细胞增殖试验, 细胞加药培养 24 h 后, 吸出培养液, 用 PBS 冲洗, 加 50 mmol/L DEA 裂解细胞, 后加 3 mmol/L 对硝基苯磷酸二钠(PNPP)作底物, 在 pH 10.5, 37 °C 条件下孵育 10 min, 用酶标仪(BioTek)测定其 A 值, 波长 405 nm。

细胞周期的测定: 根据雌激素、来曲唑对成骨细胞增殖和对碱性磷酸酶影响的结果, 选用 20 ng/L 雌激素和 250 μg/L 来曲唑作为试验组, 与对照组(未加药物组)进行细胞周期试验。将第 3

代细胞以 5×10^5 传入细胞瓶中培养 24 h 后, 将试验组培养液换成含 20 ng/L 雌激素和 250 μg/L 的培养液, 对照组仍更换不含任何药物的培养液, 培养 24 h。胰酶消化, 收集细胞。按照细胞周期试剂盒说明书操作, 进行流式细胞仪分析。

雌激素受体 mRNA 表达的测定(Real-time fluorescent quantitative RT-PCR法)[10]: 细胞培养和雌激素、来曲唑浓度同细胞增殖试验, Trizol 法提取待测细胞的总 RNA, 取 2 μg 总 RNA 反转录成 cDNA, 依据美国国立生物技术中心(NCBI)提供的雌激素受体(NM_205183)mRNA 序列, 以 GAPDH 作为内参(NM_204305)设计 PCR 引物, 由大连宝生物工程有限公司合成。

引物序列为:

雌激素受体:

上游引物 5'-GAT ACA CCT AAT GGC AAA GTC AGG-3',
下游引物 5'-TGA TTG TGA GAG AGG ATA AGG AGG AG-3',
片段长 86 bp。

GAPDH:

上游引物 5'-AGA ACA TCA TCC CAG CGT CC -3',
下游引物 5'-CGG CAG GTC AGG TCA ACA -3',
段长度为 133 bp。

PCR 反应体系为: 10 × PCR 缓冲液 2.5 μL, 上游及下游引物(50 pmol/L)各 1 μL, dNTP (10 mmol/L) 1.6 μL, MgCl₂(25 mmol/L) 1.2 μL, 反转录产物 1 μL, Taq DNA 聚合酶(Promega, Hot Star) 0.3 μL, Evagreen 1 μL, 加水至总体积 25 μL。在 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪上进行实时 PCR 定量分析。反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。每份标本均行 3 复孔检测, 取其循环阈值(CT)均值。ΔΔCT=实验组(CTER-CTGAPDH)-对照组(CTER-CTGAPDH), 2^{-ΔΔCT}为模板中雌激素受体 mRNA 含量的相对比值。

主要观察指标: ①鸡胚额骨成骨细胞增殖率。②细胞周期分布。③成骨细胞碱性磷酸酶活性。④成骨细胞雌激素受体 mRNA 表达。

设计、实施、评估者: 设计为第一作者和通讯作者, 实施为全部作者, 评估为二、三作者, 评估者经过正规培训。

统计学分析: 由本文作者用 SPSS 13.0 软件进行两组比较 t 检验。

2 结果

2.1 雌激素、来曲唑对鸡胚额骨成骨细胞增殖率的影响 见表 1。

表 1 不同质量浓度雌激素、来曲唑对成骨细胞增殖效应影响
Table 1 Absorbance in the effects of different concentration estrogen and letrozole on the proliferation of chicken osteoblast (x±s, A)

Estrogen concentration (ng /L)	Culture time	
	10 h	24 h
0 (control)	0.166±0.070	0.178±0.016
5	0.202±0.055	0.251±0.080
10	0.340±0.160 ^a	0.302±0.780 ^a
20	0.405±0.093 ^a	0.545±0.061 ^b
100	0.260±0.091	0.315±0.127 ^a
200	0.277±0.102 ^a	0.307±0.183 ^a
400	0.236±0.047	0.215±0.184
800	0.278±0.030 ^a	0.270±0.016
2 000	0.263±0.034	0.157±0.034
2 0000	0.258±0.119	0.240±0.032

Letrozole concentration (µg /L)	Culture time	
	10 h	24 h
0 (control)	0.165±0.021	0.180±0.036
5	0.168±0.030	0.170±0.017
10	0.175±0.015	0.190±0.012
25	0.177±0.026	0.195±0.039
50	0.179±0.035	0.208±0.013
100	0.177±0.036	0.203±0.034
250	0.180±0.017	0.236±0.052 ^a
500	0.175±0.047	0.210±0.033
1 000	0.170±0.011	0.178±0.028
5 000	0.172±0.031	0.198±0.038

^aP < 0.05, ^bP < 0.01, vs. the control group

雌激素质量对成骨细胞增殖作用具有浓度和时间依赖性。雌激素质量浓度在200 ng /L内, 随质量浓度上升, 其促增殖作用增强; 超过200 ng /L时, 随着质量浓度的上升, 促增殖能力逐渐下降。雌激素作用10 h后, 10, 20, 200, 800 ng /L组的A值显著高于对照组(P < 0.05); 作用24 h后, 10, 100, 200 ng /L组显著高于对照组(P < 0.05), 20 ng /L组极显著高于对照组(P < 0.01)。表明随着雌激素作用时间延长, 其促增殖作用越显著。来曲唑对成骨细胞增殖的影响不太明显, 不同质量浓度来曲唑处理成骨细胞10 h后, 各组差异不显著; 作用24 h后, 250 µg /L组A值显著高于对照组(P < 0.05), 其余各组A值与对照组相比, 差异无显著性意义(P > 0.05)。

2.2 雌激素对细胞周期的影响 见表2。

表 2 细胞周期分布
Table 2 Distribution of cell cycle (x±s, n=3)

Group	Distribution of cell cycle (%)		
	G ₁ phase	S phase	G ₂ /M phase
Control	75.54±0.06	19.20±0.10	5.36±0.04
Estrogen	71.13±0.13 ^b	22.54±0.10 ^b	6.33±0.03 ^a
Letrozole	74.98±0.48	19.89±0.12 ^a	5.13±0.36

^aP < 0.05, ^bP < 0.01, vs. the control group

雌激素组和来曲唑组的G₁期细胞比例均低于对照组, S期细胞比例均高于对照组, 雌激素组G₂/M期细胞比例极显著高于对照组、来曲唑组低于对照组。说明雌

激素、来曲唑均能改变细胞周期的进程。

2.3 雌激素、来曲唑对成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响 见表3。

表 3 不同质量浓度雌激素、来曲唑对鸡成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响
Table 3 Effects of different concentrations of estrogen and letrozole on alkaline phosphatase (ALP) activities of chicken osteoblast (Unit: Unit of King)

Estrogen concentration (ng /L)	ALP activity (x±s)	Letrozole concentration (µg /L)	ALP activity (x±s)
5	3.767±0.323	5	2.705±0.340
10	4.420±1.747 ^a	10	2.585±0.261
20	4.180±0.227	25	2.580±0.034
100	3.833±0.719	50	2.628±0.039
200	4.140±0.267	100	2.559±0.076
400	3.387±0.628	250	2.648±0.050
800	3.640±0.124	500	2.643±0.062
2 000	3.287±0.498	1 000	2.609±0.072
2 0000	3.593±0.069	5 000	2.599±0.045

^aP < 0.05, vs. the control group

雌激素对成骨细胞碱性磷酸酶活性有一定的影响, 用药24 h后, 10 ng/L组的碱性磷酸酶活性显著高于对照组(P < 0.05), 其他各组与对照组比较, 差异无显著性意义(P > 0.05); 不同浓度来曲唑作用24 h后, 对成骨细胞碱性磷酸酶没有显著影响, 各组与对照组比较, 差异无显著性意义(P > 0.05)。

2.4 雌激素、来曲唑对成骨细胞雌激素受体mRNA表达的影响 见表4。

表 4 雌激素、来曲唑对鸡成骨细胞雌激素受体 mRNA 表达的影响
Table 4 Effect of estrogen and letrozole (LLE) on the expression of estrogen receptor mRNA in chicken osteoblast (n=6)

Group	ERCT	GAPDHCT	ΔCT	ΔΔCT	2 ^{-ΔΔCT}
0 ng/L estrogen	25.12	22.85	2.27	-0.165	
0 µg/L LE (Control)	25.07	22.78	2.29	-0.145	
	25.27	22.50	2.77	0.335	
	25.99	23.06	2.43	-0.005	
	25.13	22.69	2.44	0.005	
	25.38	22.97	2.41	-0.025	
x±s	25.33±0.34	22.81±0.20	2.44±0.18	0.00±0.18	1.0(0.9-1.1)
10 ng/L estrogen	22.73	23.09	-0.36	-2.795	
	22.84	22.75	-0.09	-2.525	
	21.16	22.08	-0.92	-3.355	
	21.16	22.01	-0.85	-3.285	
	21.42	22.06	-0.64	-3.075	
	21.68	22.23	-0.55	-2.985	
	x±s	21.83±0.76 ^a	22.37±0.45	-0.57±0.31	-3.00±0.31
250 µg/L LE	26.74	22.68	4.06	1.625	
	26.83	22.91	3.92	1.485	
	27.21	23.04	4.17	1.735	
	26.56	22.65	3.91	1.475	
	26.82	22.79	4.03	1.595	
	27.18	22.83	4.35	1.915	
	x±s	26.89±0.26 ^a	22.82±0.15	4.07±0.17	1.64±0.17

^aP < 0.01, vs. the control group

雌激素、来曲唑对成骨细胞雌激素受体mRNA表达影响较大, 20 ng/L雌激素能极显著促进成骨细胞雌激素受体mRNA表达($P < 0.01$), 其表达量约为对照组8倍; 250 $\mu\text{g/L}$ 来曲唑能极显著抑制成骨细胞雌激素受体mRNA表达($P < 0.01$), 其表达量约为对照组的1/3。

3 讨论

雌激素对成骨细胞增殖影响比较复杂, 报道也不一致。Fohr等^[1]研究表明, 17 β -雌二醇可以促进MG-63和SaOS2骨肉瘤细胞增殖, 但却抑制TE85骨肉瘤细胞增殖, 对HOS85骨肉瘤细胞无明显作用^[12]。研究发现, 雌激素能够促进小鼠骨髓中成骨细胞的增殖与分化, 增加骨基质的沉积和矿化^[13-14]。本实验表明, 雌激素可以促进鸡胚颌骨成骨细胞的增殖, 且其增殖具有浓度依赖性。当雌激素质量浓度在10 ng/L和20 ng/L时, 雌激素促进鸡胚颌骨成骨细胞的增殖, 且以20 ng/L的增殖作用最强; 雌激素质量浓度高于20 ng/L时, 其增殖能力又有所下降, 且有随浓度增加而增殖能力下降的趋势, 这可能与雌激素的细胞毒性有关。

雌激素对成骨细胞的增殖作用与药物作用时间也有一定的关系, 将药物作用10 h时的A值与24 h时的A值比较, 雌激素水平低于200 ng/L时, 各组10 h的A值几乎都低于24 h A值, 说明雌激素作用时间长, 其增殖作用也明显。雌激素质量浓度大于400 ng/L, 则10 h时的A值高于24 h时的A值, 这可能是由于高浓度雌激素对成骨细胞的毒害作用引起的, 且随着雌激素作用时间的延长, 毒害作用表现的更加明显。由此可推论, 20 ng/L的雌激素质量浓度可能是鸡成骨细胞的最佳生理浓度, 当质量浓度高于20 ng/L时, 就会对鸡成骨细胞产生一定的毒害作用, 且当雌激素浓度高于400 ng/L时, 其毒害作用更加明显。雌激素能够促进成骨细胞的增殖, 主要是通过胰岛样生长因子 I (IGF- I)和转化生长因子 β (TGF- β)来实现的。研究表明, 雌激素可以刺激成骨细胞合成分泌IGF- I 和TGF- β 。张建峰等^[15]研究显示, 鸡IGF- I 能够促进鸡胚成骨细胞的增殖。TGF- β 是骨中含最多的一种生长因子, 成骨细胞本身可合成分泌TGF- β , 在成骨细胞的细胞膜上有TGF- β 的特异性受体, TGF- β 可作用于成骨细胞, 调节其增殖和分化^[16-18]。

来曲唑为第3代芳香化酶抑制剂, 与雄激素竞争, 可逆性结合到芳香化酶细胞色素P450的血红素上, 从而使雌激素生成受阻^[19-21]。关于来曲唑对成骨细胞增殖的影响还未见报道, 推论认为, 来曲唑对成骨细胞的影响是通过抑制雌激素合成而间接实现的, 如果该结论成立, 则来曲唑应该抑制成骨细胞的增殖。但本实验表明, 来曲唑对鸡胚成骨细胞增殖有一定的促进作用, 与对照组相比, 除5 $\mu\text{g/L}$ 组和1 000 $\mu\text{g/L}$ 组A值低于对照组外,

其余各组A值均高于对照组, 且250 $\mu\text{g/L}$ 组A值显著高于对照组A值($P < 0.05$)。这说明来曲唑除通过抑制雌激素来间接影响成骨细胞外, 其本身对成骨细胞也有直接促增殖作用, 但其作用机制还有待于进一步研究。

完整的细胞周期一般分为4期: G₁期, 为DNA合成前期, 蛋白质和RNA合成旺盛, 为下一步DNA复制和蛋白质合成做准备; S期, 为DNA合成期, 完成染色体的复制, 形成两个染色单体; G₂期, 为DNA合成后期, 继续进行蛋白质和RNA的合成; M期, 为有丝分裂期, 此期细胞完成核和质的分裂, 产生两个新的子细胞^[22]。细胞周期在一定程度上可反映细胞的增殖状态, S期细胞比例越高, 则细胞分裂活力强, 处于增殖旺盛的细胞比例越高^[23]。试验结果表明, 雌激素组S期细胞极显著高于对照组, 说明雌激素促进成骨细胞分裂增加, 促进了成骨细胞周期的进程。来曲唑组S期细胞显著高于对照组, 说明来曲唑也促进了细胞周期的进程。这也与细胞增殖率的结果相吻合。雌激素促进细胞进程主要与周期蛋白D1有关, 周期蛋白D1是驱动细胞周期G₁~S转换的重要周期蛋白之一, 雌激素与雌激素受体结合后, 激活有丝分裂原激活蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases, MAPKs), MAPKs可以激活细胞外信号调节激酶(Src/Shc/ERK), 并抑制c-Jun N末端激酶(JNK)信号级联反应, 引起下游转录因子, 增加周期蛋白D1的表达, 周期蛋白D1与周期蛋白依赖激酶4(Cyclin dependent kinase 4, CDK4)、CDK6结合成复合物使视网膜母细胞瘤蛋白(pRb)发生磷酸化, 高度磷酸化的pRb释放转录因子E2F-1, 推动细胞周期的进程^[24-26]。

在成骨细胞增殖晚期, 编码细胞外基质成熟的蛋白的基因开始表达, 在分化早期主要是碱性磷酸酶表达, 因而通常认为碱性磷酸酶是细胞外基质成熟的早期标志物。实验中, 培养基中添加不同质量浓度的雌激素培养24 h后, 与对照组相比, 雌激素质量浓度低于200 ng/L各组的碱性磷酸酶活性均高于对照组, 10 ng/L组活性最高, 显著高于对照组, 这与李蔚等^[27]的研究结果相一致。当雌激素质量浓度大于400 ng/L时, 雌激素对成骨细胞的毒害作用大于了它对碱性磷酸酶的促进表达作用, 因而使得其后4组的碱性磷酸酶活性低于对照组, 这也与细胞增殖率的结果相一致。

关于来曲唑对成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响还未见报道, 推论认为, 来曲唑对碱性磷酸酶的影响主要是通过雌激素来实现的, 来曲唑抑制雌激素的产生, 从而间接影响碱性磷酸酶的合成和分泌。本实验中, 各组碱性磷酸酶活性差异并不显著, 也没有明显的变化趋势, 这可能是因为体外培养体系中, 成骨细胞合成雌激素的数量有限, 来曲唑对其的抑制作用不足以通过碱性磷酸酶活性变化反应出来, 这也与来曲唑对成骨细胞的增殖率结果相一致。本实验中, 雌激素对碱性磷酸酶

的合成与分泌作用基本被排除, 各组之间的碱性磷酸酶活性又差异不显著, 这也说明来曲唑本身对碱性磷酸酶的合成与分泌也没有明显影响。

雌激素对成骨细胞碱性磷酸酶的影响也主要是通过雌激素受体来进行的。雌激素与雌激素受体结合后, 形成配体受体复合物, 诱导雌激素受体构象发生变化, 与碱性磷酸酶基因上的雌激素应答元件 (Estrogen Responsive Element, ERE) 结合, 再与转录因子相互作用, 诱导染色质结构改变^[28], 从而实现其对碱性磷酸酶表达的调控。本实验结果表明, 雌激素和来曲唑均可影响雌激素受体的表达。雌激素可以诱导鸡成骨细胞雌激素受体大量表达, 雌激素组RE mRNA表达量为对照组8倍, 差异极显著 ($P < 0.01$), 这也与徐彩红、Ladocs等^[29-30]的研究结果相一致。来曲唑可以抑制雌激素受体的表达, 使其表达量为对照组的0.32倍, 差异极显著 ($P < 0.01$)。本实验雌激素受体表达结果与细胞增殖、碱性磷酸酶活性结果也相一致。

实验结果表明, 雌激素通过诱导雌激素受体的表达来对鸡成骨细胞进行调节, 一方面可以通过促进成骨细胞的增殖以增加成骨细胞的数量; 另一方面又可以促进碱性磷酸酶的合成与分泌, 提高成骨细胞的功能, 从而更好地促进骨量的增加, 为髓质骨的迅速形成提供保证。

4 参考文献

- Whitehead CC. Bone biology and skeletal disorders in poultry. Carfax Publishing Company, Oxfordshire, England.1992:82-280
- Garcia-Moreno C, Catalan MP, Ortiz A, et al. Modulation of survival in osteoblasts from postmenopausal women. *Bone*.2004; 35:170-177.
- Zhang X, Li SW, Wu JF, et al. Effects of ipriflavone on postmenopausal syndrome and osteoporosis. *Gynecol Endocrinol*. 2009;11(8):1-5.
- Imai Y, Nakamura T, Matsumoto T, et al. Molecular mechanisms underlying the effects of sex steroids on bone and mineral metabolism. *J Bone Miner Metab*. 2009;27(2):127-30
- Spelsberg TC, Subramaniam M, Riggs BL, et al. The actions and interaction of sex steroid and growth factors/cytokines on the skeleton. *Molecular Endocrinology*. 1999;13(6): 819-828.
- Iqbal J, Zaidi M. Understanding estrogen action during menopause. *Endocrinology*. 2009;150(8):3443-3445.
- Al-Azzawi F. Prevention of postmenopausal osteoporosis and associated fractures: Clinical evaluation of the choice between estrogen and bisphosphonates. *Gynecol Endocrinol*. 2008;24(11): 601-609.
- Ngamniyom A, Magtoon W, Nagahama Y, et al. Expression levels of hormone receptors and bone morphogenic protein in fins of medaka. *Zoolog Sci*. 2009;26(1):74-79.
- Zhang JF, Hou JF, Zhang J, et al. Effect of rclGF- I on the bone-related gene expression in chicken osteoblastic cells. *Zhongguo Guzhi Shusong Zazhi*.2006;12 (3): 58 -261. 张建峰,侯加法,张皎,等. rclGF-I对鸡胚成骨细胞骨相关基因mRNA表达的影响[J].中国骨质疏松杂志,2006,12(3):258-261.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression date using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Method*.2001;25: 402-408.
- Fohr B, Schulz A, Battmann A, et al. Sex steroids and metabolism: Comparison of in vitro effects of 17 beta-estradiol and testosterone on human osteosarcoma cell lines of various gender and differentiation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2000; 108(6): 414-423.
- Miki Y, Suzuki T, Nagasaki S, et al. Comparative effects of raloxifene, tamoxifen and estradiol on human osteoblasts in vitro: estrogen receptor dependent or independent pathways of raloxifene. *J Steroid Biochem Mol Biol*.2009;113(3-5):281-289.
- Katsuyama H, Arii M, Tomita M, et al. Association between estrogen receptor alpha polymorphisms and equol production, and its relation to bone mass. *Int J Mol Med*. 2009;23(6):793-798.
- Qu Q, Perala-Heape M, Kapanen A, et al. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone*.1998;22(3): 201-209.
- Zhang JF, Hou JF, Zhang J, et al. *Zhongguo Nongye Kexue*. 2005;38(10): 2129-2133. 张建峰,侯加法,张皎,等. 鸡类胰岛素生长因子 I 的克隆、表达及其表达产物的生物学活性研究[J].中国农业科学,2005,38(10):2129-2133.
- Tao SQ, Pan XC, Rong JS, et al. *Zhongguo Guzhi Shusong Zazhi*. 2005;11(3): 302-305. 陶树清,潘宣超,荣杰生.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.
- Inkson CA, Ono M, Kuznetsov SA, et al. TGF-beta1 and WISP-1/CCN-4 can regulate each other's activity to cooperatively control osteoblast function. *J Cell Biochem*.2008;104(5):1865-1878.
- Dufour C, Holy X, Marie PJ. Transforming growth factor-beta prevents osteoblast apoptosis induced by skeletal unloading via PI3K/Akt, Bcl-2, and phospho-Bad signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.2008;294(4):E794-801.
- Chow L W, Yip A Y, Loo W T, et al. Evaluation of neoadjuvant inhibition of aromatase activity and signal transduction in breast cancer. *Cancer Letters*. 2008;262: 232-238.
- Per EL, Jurgen G. Aromatase inhibitors: Assessment of biochemical efficacy measured by total body aromatase inhibition and tissue estrogen suppression. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.2008;108: 196-202
- Keating GM. Letrozole: a review of its use in the treatment of postmenopausal women with hormone-responsive early breast cancer. *Drugs*. 2009;69(12):1681-1705.
- Wang KR, Xue SB, Liu HT. Beijing: Beijing normal university publishing house. 1998. 汪堃仁,薛绍白,柳惠图.细胞生物学[M]. 2版.北京:北京师范大学出版社,1998.
- Liu YWi, Liu N, Han B, et al. *Zhongguo Xumu Shouyi Xuebao*. 2009;40(1):117-121. 刘彦威,刘娜,韩博,等.冬虫夏草菌丝粗多糖对SP2/0细胞凋亡和p53表达的影响[J].中国畜牧兽医学报,2009,40(1):117-121.
- Takano H, Aizawa T, Irie T, et al. Normal bone growth requires optimal estrogen levels: negative effects of both high and low dose estrogen on the number of growth plate chondrocytes. *Tohoku J Exp Med*. 2008;214(3):269-280.
- Li JB, Li HQ, Wang SY. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*.2009;13(7): 1242-1246. 李继斌,黎海芪,王松艳.雌性激素对胚生长期软骨细胞周期调节蛋白的作用[J].中国组织工程研究与临床康复, 2009,13(7):1242-1246.
- Matsubayashi S, Nakashima M, Kumagai K, et al. Immunohistochemical analyses of b-catenin and cyclinD1 expression in giant cell tumor of bone (GCTB): A possible role of Wnt pathway in GCTB tumorigenesis. *Path Res Pract*.2009: Article in Press [Epub ahead of print]
- Li W, Sun YP, Zhu GY. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2008;12(11): 2061-2064. 李蔚,孙宜萍,朱国英.雌激素在体外对大鼠成骨细胞的作用[M].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(11):2061-2064.
- Lv BZ, Lu JA, An MB. Hefei: Anhui Science and Technology Publishing House. 2000:228-252. 吕宝璋,卢建,安明榜.受体学 [M].合肥:安徽科学技术出版社,2000, 228-252.
- Xu CH, Zhang J, Wei L. *Jiepou Xuebao*.2006;37(5):573-577. 徐彩红,张京,卫兰.外源性己烯雌酚对新生雌性BALB/c小鼠脾内细胞雌激素受体表达的影响[J].解剖学报,2006,37(5):573-577.
- Ladocs GS, Smith C, Nicastro SC, et al. Evaluation of the primary humoral immune response following exposure of male rats to 17beta estradiol or flutamide for 15 days. *Toxicol Sci*.1998;46(1): 752-782.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 国家自然科学基金资助项目(30671546), 南京农业大学青年创新基金资助项目(KJ0716)。

利益冲突: 无利益冲突。