

· 论 著 ·

Osterix 在调控脊椎松质骨骨量中的作用*

宗兆文¹,陈思旭¹,贾 敏¹,华 祥¹,郭庆山¹,沈 岳¹,赵玉峰¹,刘道城¹,Jerry Feng²

(1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤/烧伤与复合伤国家重点实验室创伤科,重庆 400042;

2. 德克萨斯州卫生科学中心 Baylor 医学院生物医学系,美国德克萨斯州达拉斯 75246)

摘 要:目的 观察 Osterix 在调控脊椎松质骨骨量的作用及机制。方法 以 Osterix 敲除小鼠和 Osterix 转基因小鼠为观察对象,采用 X 线摄像、显微电子计算机 X 线断层摄影术(Micro-CT)和苏木素-伊红(HE)染色观察 Osterix 过表达或敲除后小鼠腰椎骨量的变化,抗酒石酸性磷酸酶(TRAP)染色观察破骨细胞的变化。免疫组织化学检测核因子-κB 受体活化因子配体(RANKL)表达情况的变化。结果 Osterix 转基因小鼠腰椎骨量没有明显变化,而 X 线片、Micro-CT 和 HE 染色检测显示 Osterix 敲除小鼠在出生后 12 周脊椎密度和骨量增加;TRAP 染色显示腰椎中破骨细胞数量减少;免疫组织化学染色检测显示其椎体中 RANKL 表达水平降低。结论 Osterix 在调控脊椎松质骨骨量中起到重要作用。

关键词:脊柱;Osterix;骨量
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.04.001 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2014)04-0385-03

The role of Osterix in controlling bone volume in vertebral body*

Zong Zhaowen¹,Chen Sixu¹,Jia Min¹,Hua Xiang¹,Guo Qingshan¹,Shen Yue¹,Zhao Yufeng²,Liu Daocheng¹,Jerry Feng²

(1. Department of Trauma Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China;

2. Department of Biomedicine, Baylor College of Dentistry, Health and Science Center, Dallas 75246 TX, USA)

Abstract:Objective To observe the role of Osterix in controlling bone volume in vertebral body and to investigate the possible mechanism. **Methods** X-ray radiology, micro CT and HE staining were used to evaluate the change of bone volume in both Osterix knockout and transgenic mice. TRAP staining was used to assess the activity of osteoclasts and immunohistochemistry was used to examine the expression level of RANKL. **Results** No obvious changes were found in Osterix transgenic mice, while X-ray examination, micro CT and HE staining showed that the bone density and bone volume in the lumbar vertebral body increased significantly in OSX null mice 12 weeks after birth. TRAP staining showed that the number of osteoclasts decreased in OSX null mice. IHC revealed that the expression level of RANKL was down-regulated in OSX null mice. **Conclusion** Osterix play an important role in controlling bone volume of vertebral body in mice.

Key words: spine; Osterix; bone volume

骨质疏松是一种以骨量低下、骨微结构破坏为特点,进而导致骨脆性增加,易发生骨折为特征的全身性骨病^[1]。骨质疏松不仅威胁中老年人的健康,也给家庭和社会带来的沉重的经济负担。骨质疏松被认为是一个多因素疾病,但其具体发病机制尚不明了,导致其防治效果不佳^[2-3]。Osterix 是重要的成骨相关转录因子,被证实成骨细胞的成熟和向骨细胞的终末分化中起到重要作用^[4-6]。本研究通过转基因和基因敲除的方法观察 Osterix 在调控脊椎骨量中的作用,并探索其可能机制,以期探索骨质疏松的发病机制提供一定线索。

1 材料与方法

1.1 材料 Osterix Lox P +/+ 小鼠、2.3 kb Collagen I Cre 小鼠和 3.6- kb Cre Osterix 转基因小鼠由美国德克萨斯州卫生科学中心 Baylor 医学院 Jerry Feng 教授馈赠。Osterix Lox P +/+ 小鼠和 2.3 kb Collagen I Cre 小鼠杂交以获得 Osterix Lox P +/+; 2.3 kb Collagen I Cre 小鼠进而敲除 Osterix。

1.2 方法

1.2.1 常规 PCR 进行基因型鉴定 取新生 9 d 小鼠适量尾巴,常规方法提取基因组 DNA,然后取 1 μg 提取的 DNA 常规 PCR 进行基因型鉴定。Osterix 敲除小鼠使用的引物为:5'-CTT GGG AAC ACT GAA GCT GT-3'和 5'-CTG TCT TCA

CCT CAA TTC TAT T-3'; Osterix 转基因小鼠使用的引物为:5'-GAA GCG ACC ACT TGA GCA AAC AT-3'和 5'-TGT CCA AAC TCA TCA ATG TAT CT-3'。

1.2.2 X 线片检查 出生后 12 周,戊巴比妥那过量麻醉致死野生型小鼠、Osterix 转基因小鼠和 Osterix 敲除小鼠(n=4),取腰段脊柱,4%多聚甲醛 4 ℃ 过夜固定,次日剔除脊柱周围软组织,拍摄脊柱 X 线片。

1.2.3 显微电子计算机 X 线断层摄影术(micro-computerized tomography, Micro-CT)检测 取上述小鼠第 5 腰椎,采用 Micro-CT 机(Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland)进行常规扫描,计算其骨量与脊椎总体积的比值(bone volume / total volume, BV/TV)。

1.2.4 组织学处理 取上述标本中的第 5 腰椎 10% 乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙后,制备石蜡切片。冠状面 5 μm 切片,常规脱蜡和梯度乙醇水化切片备用。

1.2.5 苏木素-伊红(HE)染色 5 μm 组织切片常规进行 HE 染色。方法简述如下:取 1.3 中准备好的切片苏木素染色 5 min,自来水冲洗 1~3 s 后 1% 盐酸乙醇分色 1~3 s。蒸馏水过洗 1~2 s 后 0.5% 伊红染色 1 min,蒸馏水稍洗 1~2 s 后梯度乙醇脱水、二甲苯透明后中性树胶封固切片。

* 基金项目:创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室自主课题(SKLZZ201124);“十二五”科研项目重大项目分课题(AWS11J008);国家自然科学基金面上项目(81271935)。 作者简介:宗兆文(1975—),主任医师,博士,主要从事严重骨创伤救治的临床和基础研究。

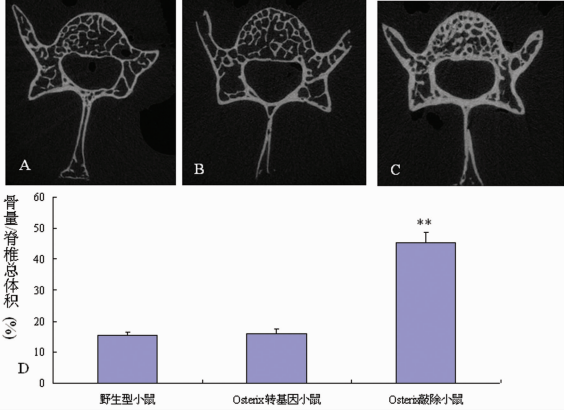
1.2.6 抗酒石酸性磷酸酶(TRAP)染色 预热两个装有 50 mL 基础孵育液的玻璃染色缸至 37 ℃,然后在其中一个加入 50 μL 2% 磷酸萘酚,加入 1.2.3 处理好的片子,37 ℃孵育 45 min。然后将 1 mL 5% 副品红和 1 mL 4% 亚硝酸钠混匀后加入另一个染色缸,将切片转移到第二个染色缸,染色约 2 min。蒸馏水漂洗后用甲基绿对抗染色,然后常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明后中性树胶封固切片。其中基础孵育液配制方法为将 9.2 g 无水醋酸钠、11.4 g 无水酒石酸钠和 2.8 mL 冰醋酸加入蒸馏水,并定容为 1 000 mL,并调节 pH 值为 4.7~5.0。

1.2.7 免疫组织化学染色 取 1.2.3 中准备好的切片,3% H₂O₂ 封闭切片用 1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)充分漂洗后加非特异性封闭血清室温封闭 1 h 后加羊抗兔 RANKL 一抗,4 ℃孵育过夜。次日 PBS 漂洗 3 次后加入相生物素化小鼠抗羊二抗,室温孵育 1 h。PBS 充分漂洗后 DAB 显色,适度显色后蒸馏水终止反应然后用甲基绿对抗染色。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

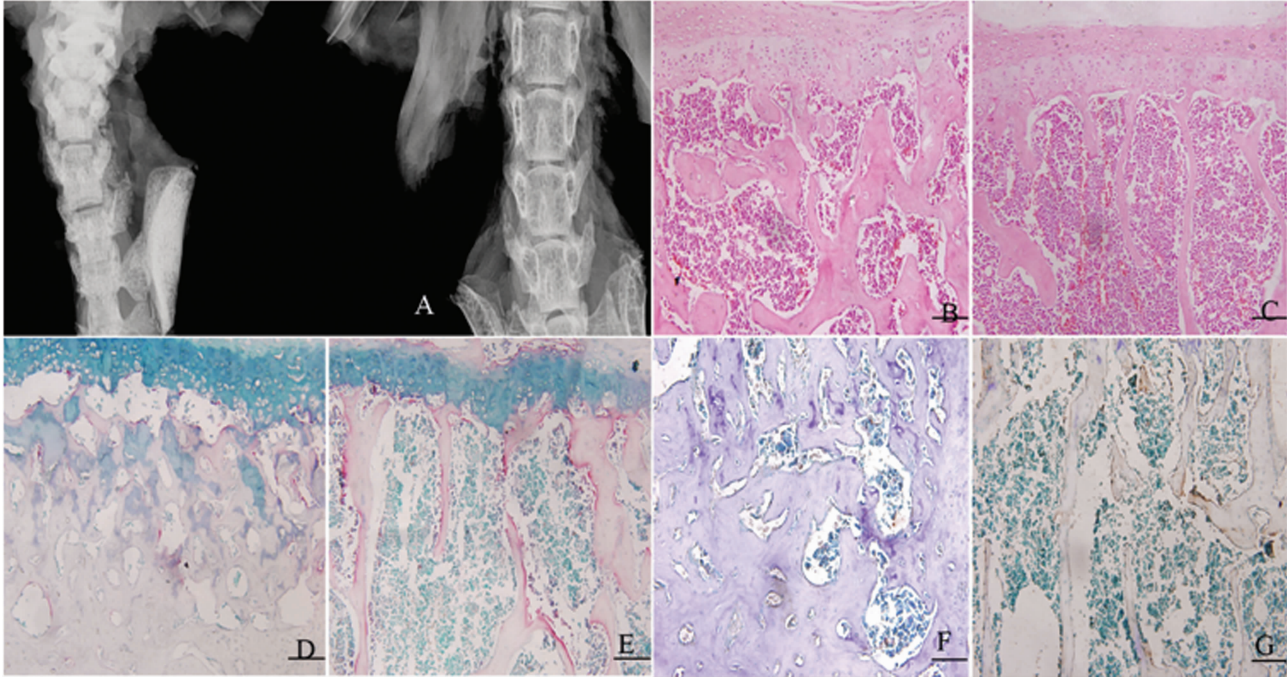
2 结 果

2.1 Osterix 敲除小鼠骨量增加 Mico-CT 结果显示,Osterix 转基因小鼠中的骨小梁数量同野生型小鼠之间无明显差异,而 Osterix 敲除小鼠第 5 腰椎中骨量大量增加,明显高于野生型小鼠,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。



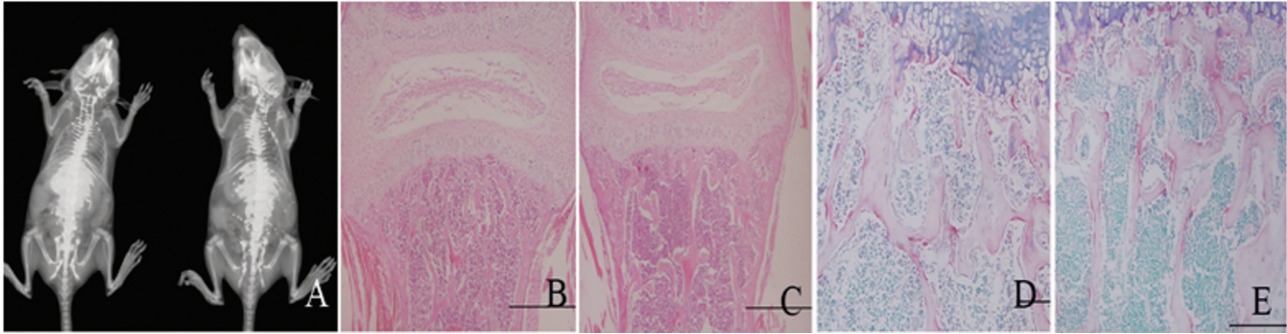
A:野生型小鼠第 5 腰椎;B:Osterix 转基因小鼠腰椎;C:Osterix 敲除小鼠腰椎;D:3 种小鼠中骨量定量分析结果。

图 1 Micro-CT 检测 3 种小鼠脊椎中骨量的差别。



A:Osterix 敲除小鼠(左)和野生型小鼠(右)的 X 线片;B:Osterix 敲除小鼠的 HE 染色;C:野生型小鼠的 HE 染色;D:Osterix 敲除小鼠的 TRAP 染色;E:野生型小鼠的 TRAP 染色;F:Osterix 敲除小鼠的 RANKL 免疫组织化学染色;G:野生型小鼠的 RANKL 免疫组织化学染色。

图 2 Osterix 敲除小鼠的特征



A:Osterix 转基因小鼠(左)和野生型小鼠(右)的 X 线片;B:Osterix 转基因小鼠的 HE 染色;C:野生型小鼠的 HE 染色;D:Osterix 转基因小鼠的 TRAP 染色;E:野生型小鼠的 TRAP 染色。

图 3 Osterix 过表达转基因小鼠的特征

2.2 Osterix 敲除小鼠破骨细胞数量减少 X 线片检测显示在出生后 12 周, Osterix 敲除小鼠脊椎骨密度增加, HE 检测显示其椎体中骨量增加。采用 TRAP 染色检测了 Osterix 敲除小鼠脊椎中破骨细胞的数量, 结果发现 Osterix 敲除小鼠脊椎中破骨细胞的数量和染色强度明显低于野生型小鼠。免疫组织化学染色结果显示, Osterix 敲除小鼠脊椎中 RANKL 表达水平低于野生型小鼠, 见图 2。

2.3 Osterix 过表达转基因小鼠骨量无显著变化 而在 Osterix 转基因小鼠中, 脊椎 X 线片显示其密度和 HE 染色显示其骨量同野生型小鼠无显著差异。同时, TRAP 染色和免疫组织化学检测显示 Osterix 转基因小鼠脊椎中破骨细胞数量和 RANKL 表达水平同野生型小鼠无显著性差异, 见图 3。

3 讨 论

随着世界人口日趋老龄化, 骨质疏松的发病率越来越高, 对中老年人的身体健康构成严重的威胁。骨质疏松治疗主要的目的是提高骨强度以减少骨折的发生率^[7]。骨强度由多种因素决定, 其中骨量是重要因素之一^[8-10]。参与骨量调节的因素和信号转导通路有多种, 但尚不确定哪种因素或哪条信号通路起到重要作用^[3,11-14]。

Osterix 是成骨过程中重要的转录因子。胚胎期敲除 Osterix 导致小鼠完全没有骨性成分形成, 出生后敲除 Osterix 后小鼠的成骨细胞成熟和向骨细胞分化严重受阻^[4-6]。这些结果提示, Osterix 无论在胚胎期还是出生后的骨发育和骨成熟中起到重要作用。鉴于 Osterix 在成骨中的重要作用, 笔者通过基因敲除和转基因小鼠观察了其在调控腰椎骨量中的作用。本研究发现, Osterix 过表达的转基因小鼠骨量无明显变化, 而 Osterix 敲除小鼠腰椎骨量明显增加, 提示 Osterix 在调控小鼠腰椎骨量中起到不可或缺的重要作用。

由于成骨和破骨之间的平衡决定最终的骨量的多少, 而有研究已经证实 Osterix 敲除小鼠的成骨能力明显低于野生型小鼠^[4-6]。因此, 笔者进一步观察了 Osterix 敲除小鼠的破骨细胞的活性和数量变化情况, TRAP 染色结果显示, Osterix 敲除小鼠脊椎中破骨细胞数量明显下降。因而在 Osterix 敲除小鼠中, 其成骨和破骨能力均下降, 但后者下降的更明显, 导致总的效应为骨量增加。

在破骨细胞成熟的过程中, 成骨细胞等分泌 RANKL 调节其成熟^[15-17]。本研究发现, Osterix 敲除小鼠脊柱中 RANKL 的表达水平明显下调, 这是导致破骨细胞的数量明显降低的原因。而破骨细胞数量的减少, 导致成骨与破骨之间的平衡被打破, 引起 Osterix 敲除小鼠脊椎中骨量增加。

综上所述, Osterix 在调控脊椎骨量中起到重要作用, 其主要的机制是通过调节成骨和破骨细胞之间的平衡得以实现。而 Osterix 在调节脊椎骨量的过程中与其他信号通路之间的相互作用关系需要进一步观察, 以更好为治疗骨质疏松提供好的线索。

参考文献:

- [1] Baron R. Osteoporosis in 2011: Osteoporosis therapy—dawn of the post-bisphosphonate era[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2011, 8(2): 76-78.
- [2] Landete-Castillejos T, Molina-Quilez I, Estevez JA, et al. Alternative hypothesis for the origin of osteoporosis: the role of Mn [J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012, 4: 1385-

1389.

- [3] Brandt ML. An overview of osteoporosis: from genetics to clinics[J]. *Aging Clin Exp Res*, 2011, 23(2 Suppl): 3-5.
- [4] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation [J]. *Cell*, 2002, 108(1): 17-29.
- [5] Baek WY, de Crombrughe B, Kim JE. Postnatally induced inactivation of Osterix in osteoblasts results in the reduction of bone formation and maintenance [J]. *Bone*, 2010, 46(4): 920-928.
- [6] Zhou X, Zhang Z, Feng JQ, et al. Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(29): 12919-12924.
- [7] van den Bergh JP, van Geel TA, Geusens PP. Osteoporosis, frailty and fracture: implications for case finding and therapy[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(3): 163-172.
- [8] 陈隽, 李裕华, 张莉萍, 等. 重庆地区骨质疏松症维生素 D 受体基因与骨密度关系的初探 [J]. *重庆医学*, 2003, 32(7): 881-882.
- [9] Davison KS, Siminoski K, Adachi JD, et al. Bone strength: the whole is greater than the sum of its parts [J]. *Semin Arthritis Rheum*, 2006, 36(1): 22-31.
- [10] Friedman AW. Important determinants of bone strength: beyond bone mineral density [J]. *J Clin Rheumatol*, 2006, 12(2): 70-77.
- [11] 陶晖, 余美春, 杨会营, 等. 脂肪源干细胞移植对糖皮质激素性骨质疏松骨量影响的实验研究[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(5): 817-821.
- [12] 罗改莹, 鲁晓东. 25-羟-维生素 D 与类风湿患者骨质疏松的相关性分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(3): 296-298.
- [13] 刘亦恒, 张寿, 张海英, 等. 甲基强的松龙治疗大鼠急性脊髓损伤后对骨密度及生物力学的影响[J]. *海南医学院学报*, 2010, 16(7): 824-826.
- [14] 肖登, 杨霖, 雷中杰, 等. 不同强度脉冲电磁场对去卵巢大鼠股骨骨密度的影响[J]. *激光杂志*, 2011, 32(5): 61-62.
- [15] 杨健, 谭颖徽, 裴松波. 核因子- κ B 受体活化因子配体诱导大鼠骨髓破骨细胞形成的实验研究 [J]. *重庆医学*, 2004, 33(3): 385-388.
- [16] Dempster DW, Lambing CL, Kostenuik PJ, et al. Role of RANK ligand and denosumab, a targeted RANK ligand inhibitor, in bone health and osteoporosis: a review of pre-clinical and clinical data[J]. *Clin Ther*, 2012, 34(3): 521-536.
- [17] Conaway HH, Pirhayati A, Persson E, et al. Retinoids stimulate periosteal bone resorption by enhancing the protein RANKL, a response inhibited by monomeric glucocorticoid receptor [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(36): 31425-31436.