

## Graves 病患者甲状腺组织雄激素受体表达的研究

汤 玮<sup>1</sup>, 何 金<sup>2</sup>, 冯晓云<sup>1</sup>, 刘志民<sup>1</sup>, 林 朗<sup>1</sup>, 谈 雯<sup>1</sup>, 邹俊杰<sup>\*</sup>

(1. 第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003; 2. 第二军医大学长征医院病理科, 上海 200003)

**[摘要]** **目的:** 考察 Graves 病患者血浆睾酮(testosterone, T)浓度以及其外周血白细胞和甲状腺组织中雄激素受体(androgen receptor, AR)水平, 以探讨雄激素及其受体与 Graves 病的关系。**方法:** 以 8 例女性 Graves 病患者、8 例甲状腺腺瘤患者及 8 例配对的健康对照者为研究对象, 采用酶联免疫分析法测定血浆 T 浓度, 放射配体结合法检测患者外周血白细胞<sup>3</sup>H 雄激素(T)特异结合位点, RT-PCR 检测外周血白细胞 AR 的 mRNA 表达, 免疫组织化学法检测甲状腺组织 AR 水平。**结果:** Graves 病组和对照组血浆 T 浓度分别为(660±80) ng/L 及(620±100) ng/L, 组间无明显差异( $P>0.05$ ); 两组外周血白细胞<sup>3</sup>H-T 特异结合位点分别为(381±105)位点/细胞、(572±141)位点/细胞, 组间差异显著( $P<0.05$ ); Graves 病患者外周血白细胞 AR 的 mRNA 表达量显著高于对照组( $P<0.05$ ); 免疫组化检测显示, Graves 病患者甲状腺组织 AR 水平显著高于正常甲状腺组织( $P<0.01$ )。**结论:** Graves 病患者血浆 T 浓度较正常对照组无明显变化, 但外周血白细胞 AR 的 mRNA 表达和甲状腺组织中 AR 水平均增高, 考虑是机体保护性反应的调节。此外, 也可能与病理情况下性激素结合能力下降、AR 不能良好发挥生理效应相关。外周血白细胞中蛋白结合活性检测结果降低, 推测是甲亢患者 AR 分解加速所致。

**[关键词]** 格雷夫斯病; 受体, 雄激素; 白细胞; 甲状腺**[中图分类号]** R 581 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)07-0768-04

## Expression of androgen receptor gene in thyroid tissues of patients with Graves disease

TANG Wei<sup>1</sup>, HE Jin<sup>2</sup>, FENG Xiao-yun<sup>1</sup>, LIU Zhi-min<sup>1</sup>, LIN Lang<sup>1</sup>, TAN Wen<sup>1</sup>, ZOU Jun-jie<sup>\*</sup> (1. Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To observe the serum testosterone (T) level and androgen receptor (AR) mRNA expression in peripheral leukocytes and thyroid tissues of patients with Graves disease, so as to investigate the relationship between the testosterone and androgen receptor with hyperthyroidism. **Methods:** Blood samples were collected from 8 female patients with Graves disease, 8 female patients with thyroid adenoma and 8 healthy control subjects; the patients were paired in gender and age. The plasma concentrations of testosterone were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the [<sup>3</sup>H]-T specific binding sites in the peripheral leukocytes were determined by radioligand binding assay; the expression of AR mRNA in peripheral leukocytes were determined by RT-PCR; and the level of AR in thyroid tissues was determined by immunohistochemistry method. **Results:** The plasma concentrations of T were (660±80) ng/L and (620±100) ng/L in Graves disease group and control group, respectively ( $P>0.05$ ); the [<sup>3</sup>H]-T specific binding sites were (381±105) sites/cell and (572±141) sites/cell in peripheral leukocytes, respectively ( $P<0.05$ ). The mRNA expression of AR in Graves disease group was significantly higher than that in the control group ( $P<0.05$ ). The result of immunohistochemistry showed that the level of AR in thyroid tissues was higher in Graves group than that in the control group. **Conclusion:** The plasma level of T in patients with Graves disease is similar to that of normal controls, but the mRNA expression of AR in peripheral leukocytes and thyroid tissue is higher in Graves disease group than in the control group, which is supposed to be a protective reaction. Moreover, the binding capability of AR is lower in Graves disease group than that in the control group, which is probably caused by the accelerated decomposition of AR.

**[KEY WORDS]** Graves disease; receptors, androgen; leukocytes; thyroid gland

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(7):768-771]

Grave 病为自身免疫性疾病, 具体病理机制目前尚不明确。Grave 病的发病存在显著性别差异, 女性与男性发病率比例约为 8 : 1, 提示可能与性激素的病理生理作用有关。雄激素(testosterone, T)有对抗炎症反应的特性, 在多种自身免疫的动物模型中发挥免疫抑制作用, 雄激素受体(androgen re-

**[基金项目]** 上海市卫生局青年科研基金(0537042), 长征医院“三重三优”基金。Supported by Youth Science Foundation of Shanghai Health Bureau(0537042) and Key Superior Program of Changzheng Hospital.

**[作者简介]** 汤 玮, 博士, 主治医师。

\* Corresponding author. E-mail: zjj1688@163.com

ceptor,AR)作为 T 依赖性转录激活因子介导其生理效应。本研究通过比较 Grave 病患者与正常对照者外周血及甲状腺组织中 T 与 AR 的水平,探讨其在 Graves 病中的作用机制及意义。

## 1 对象和方法

1.1 对象 Graves 病患者 8 例,女性,年龄 17~61 (37±17)岁;甲状腺腺瘤女性患者 8 例,年龄 27~56(43±10)岁;健康体检者 8 例,女性,年龄 24~55 (41±13)岁。所有入选者明确无心、肺、肝、肾及内分泌疾病,且自愿参加该项研究,并签署知情同意书。研究对象均于晨 8:00 抽取静脉血 20 ml,肝素抗凝,分离白细胞与血浆,细胞于显微镜下计数,标本用液氮贮存备用。8 例 Graves 病患者和 8 例甲状腺腺瘤患者于本院普外科进行手术治疗,术中留取 Graves 病患者病灶区甲状腺组织、甲状腺腺瘤周围正常甲状腺组织备用。

1.2 主要试剂 葡聚糖 T500 购于 Phamacia Biotech 公司,放免血浆睾酮测定试剂盒购自天津九鼎生物制品有限公司,异硫氰酸胍购于 Life Technologies 公司,一抗和 SP 试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司,<sup>3</sup>H-T 购自英国放化中心。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 血浆雄激素水平测定 用酶联免疫法测定血浆 T 浓度。

1.4 外周血白细胞<sup>3</sup>H-T 特异结合位点检测 采用放射配体结合法。将分离后的白细胞用 Hanks(pH 7.35)液调至(1~3)×10<sup>7</sup>个细胞/ml,取 0.5 ml 悬液加 1 nmol/L 的<sup>3</sup>H-T。37℃保温 1 h。放入冰水终止反应后迅速通过玻璃纤维滤膜(孔径 1 μm, Whatman GF/B)负压滤过,继以 3 ml 冷 PBS 液洗 2 次。滤膜经 80℃、20 min 烘干,放入闪烁液。用美国 Beckman LS-5000C 液闪仪计数。采用近饱和浓度作一点分析。

1.5 外周血白细胞 AR mRNA 表达的检测 取分离好的外周血白细胞,采用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法,经苯酚-氯仿抽提 2 次,获得纯度更高的 RNA 样品。

RT-PCR 引物由中国科学院上海生物化学研究所提供,AR 引物序列如下: Primer 1: 5'-CAC AGG CTA CCT GGT CCT GG -3'; Primer 2: 5'-CGG GTT CTC CAG CTT GAT GCG-3'; Primer 3: 5'-TCA GAA ATG GTC GAA GTG CCC-3'。β-actin RNA 引物序列如下: Primer1: 5'-TGG GCA TGG GTC AGA AGG AT-3'; Primer2: 3'-GAG

GCG TAC AGG GAT AGC AC-5'。

取总 RNA 1 μg,10 pmol Primer 2,70℃变性 10 min,dNTP (10 mmol/l) 1 μl,DTT 2 μl,5(Buffer 4 μl, Superscript 酶 1 μl,于 42℃反应 1 h,95℃ 5 min 终止反应。取 5 pmol Primer 1,5 pmol Primer 3,逆转录产物 1 μl,Taq 酶 0.1 μl(2 U),10(Buffer 2 μl,dNTP(2.5 mmol/l) 1.6 μl,总反应体积 20 μl。94℃预变性 5 min,94℃ 1 min,64℃ 1 min,72℃ 1 min,共 30 个循环,72℃延伸 10 min。

1.6 甲状腺组织 AR 水平检测 免疫组织化学法 16 例甲状腺标本经 10%中性甲醛固定,常规脱水、石蜡包埋,连续切片,厚 5 μm。经二甲苯和梯度乙醇脱蜡脱水,用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液作用 10 min,除去内源性过氧化物酶的活性。蒸馏水冲洗后用 0.4%胃蛋白酶 32~33℃作用 10 min,蒸馏水冲洗,切片浸入枸橼酸缓冲液(0.1 mmol/L,pH 6.0)于微波炉 92~98℃修复抗原 10 min。室温冷却 10 min,磷酸缓冲液(PBS)冲洗,用阻断血清封闭 20 min 以减少非特异性染色,加入一抗兔抗雄激素受体,在湿盒中 4℃过夜。PBS 洗涤后,加入二抗羊抗兔抗体,室温孵育 30 min。PBS 冲洗,加入 ABC 复合物室温孵育 30 min。最后在二甲氨基偶氮苯(DAB)溶液中显色 5~15 min,在显微镜下控制显色时间。PBS 洗涤,苏木精复染,梯度乙醇脱水,封片观察。以已知 AR 阳性的前列腺增生病变标本为阳性对照,以 PBS 代替一抗、二抗做阴性对照。细胞内出现棕黄色为阳性细胞,阳性细胞≥20%为阳性,阳性细胞<20%为阴性。由 2 名工作人员逐一观察同一切片,以 2 人判断结果核对后作为受体定性及定位的依据。

1.7 统计学处理 酶联免疫分析和放射配体结合法实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间均数比较用 *t* 检验。免疫组织化学法实验数据输入计算机中,应用 Stata 8.0 统计软件包,采用 Fisher 精确概率法进行统计学处理。

## 2 结果

2.1 血浆 T 水平和白细胞<sup>3</sup>H-T 结合能力测定 血浆 T 水平 Graves 病组和对照组分别为(660±80) ng/L 及(620±100) ng/L,两组无明显差异(*P*>0.05),白细胞<sup>3</sup>H-T 放射配体结合测定结果 2 组分别为(381±105)和(572±141)位点/细胞,Graves 病患者均明显低于对照组(*P*<0.05)。

2.2 外周血白细胞 AR mRNA 表达 两组 PCR

反应产物进行凝胶电泳后经激光光密度仪扫描,以其光密度值作为 AR mRNA 表达量比较,Graves 病患者外周血白细胞 mRNA 表达量显著高于正常对照组,如图 1 所示。

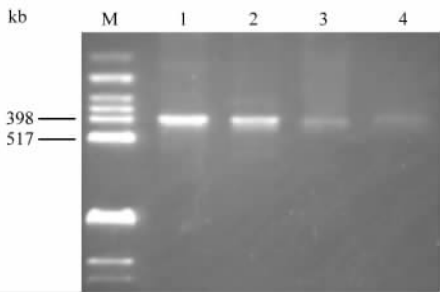


图 1 Graves 病患者与对照组外周血白细胞 AR mRNA 表达产物的凝胶电泳结果

M:pBR322+Hinf I ;1,2:Graves 病患者组;3,4:正常对照组

2.3 甲状腺组织 AR 水平检测 Graves 病患者甲状腺滤泡细胞增大呈立方形,AR 呈现棕黄色阳性染色,以胞质内分布为主,胞膜和胞核也有,高倍镜下见胞质阳性反应物呈颗粒状,腺泡底部和周边细胞阳性染色较强,移行至腺泡中心部细胞阳性染色渐弱(图 2A)。阳性对照组前列腺癌标本 AR 阳性反应定位在细胞质和细胞核,细胞膜未出现阳性染色(图 2B)。阴性对照片均未出现染色反应(图 2C)。Graves 病甲状腺组织 AR 阳性率(75%)显著高于正常对照组(12.5%, $P<0.01$ )。

### 3 讨论

自身免疫性疾病的发病率存在显著性别差异,有关性激素及受体在自身免疫性疾病的作用近年来

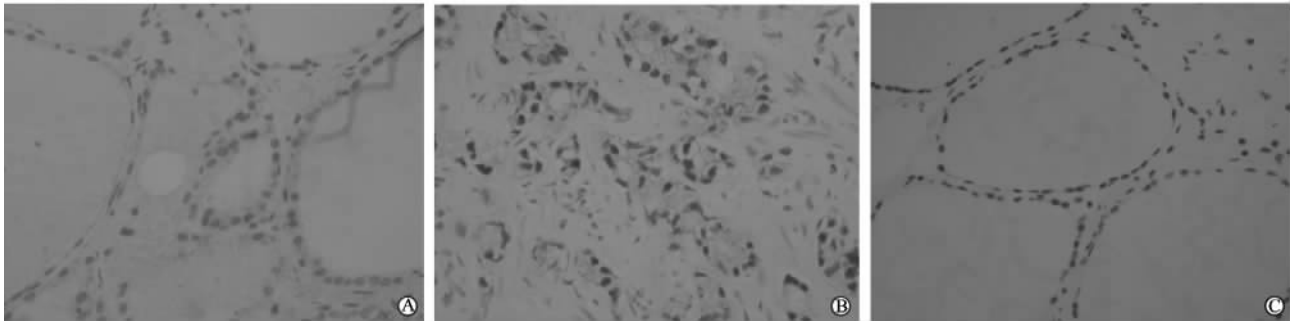


图 2 免疫组织化学法检测甲状腺组织 AR 水平

A:Graves 病组甲状腺滤泡上皮细胞;B:前列腺癌标本(阳性对照);C:PBS(阴性对照)

受到许多学者的关注。AR 是类固醇核受体家族中的一员,在人体内分布广泛。Liva 等<sup>[1]</sup>研究发现 T 可通过 AR 作用于 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞,增加 IL-10 细胞因子的表达。Dulos 等<sup>[2]</sup>研究认为,T 可显著降低 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>淋巴细胞的比例,并通过 AR 加速胸腺细胞的凋亡,而雌激素(estrogen, E)没有此作用。由此推断,T 和 AR 可能是自身免疫性疾病发病性别差异的原因之一。

Graves 病的病因不明,目前普遍认为与患者自身免疫耐受的缺乏有关。本研究对 Graves 病患者血浆 T 浓度及 AR 在外周血白细胞和甲状腺组织中的水平进行了观察,结果显示,Graves 病患者血浆<sup>3</sup>H-T 浓度较正常对照组无明显变化。外周血白细胞 AR mRNA 表达较正常对照组增多( $P<0.05$ ),但受体结合活性显著降低( $P<0.05$ ),与既往研究结果<sup>[3,6]</sup>相似。这种 mRNA 表达与蛋白结合水平间的差异,可能与 Graves 病患者白细胞 AR mRNA 翻译成蛋白质的过程受阻或患者 AR 的分解加速有

关。此外,病理情况下 AR 激素结合能力下降,AR 不能良好发挥生理效应,也可能是蛋白结合活性检测结果降低的重要原因。

免疫组化染色结果显示,Graves 病患者甲状腺滤泡细胞的胞质中 AR 水平明显高于正常甲状腺组织,胞膜和胞核也有染色。已有研究显示,当 T 缺乏时,AR 主要定位于胞质,当内源性 T 存在时,AR 则主要定位于胞核,并且能够激活 AR 反应性基因的转录。目前认为性激素有双向剂量作用,如低剂量激素能增强免疫活性,而高剂量能阻止特殊的免疫活性。因此,Graves 病患者甲状腺滤泡细胞的胞质中 AR 高表达,提示 T 可能通过 AR 对甲状腺组织发挥保护作用。

以上结果分别从基因水平和蛋白水平证实了 Graves 病患者 AR 在外周血白细胞和甲状腺滤泡细胞的改变,均支持雄激素在 Graves 病的发病中起一定作用,为研究 T 影响白细胞功能的机制及探讨病理情况下 T 和 AR 的作用机制奠定了基础,对选

择治疗及评价预后有重要意义。

### [参考文献]

[1] Liva S M, Voskuhl R R. Testosterone acts directly on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes to increase IL-10 production[J]. *J Immunol*, 2001, 167:2060-2067.  
[2] Dulos G J, Bagchus W M. Androgens indirectly accelerate thymocyte apoptosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2001, 1:321-328.  
[3] Banu S K, Govindarajulu P A, Rulldhas M M. Testosterone and estradiol up-regulate androgen and estrogen receptors in immature and adult rat thyroid glands *in vivo* [J]. *Steroids*, 2002, 67 (13-14):1007-1014.  
[4] 刘志远,汪成,刘志民,等. Graves病患者外周血白细胞雌、雄

激素受体变化的初步研究[J]. *标记免疫分析与临床*, 1997, 4: 210-213.

[5] 邹俊杰,李富元,商权,等. 弥漫性甲状腺肿伴甲状腺功能亢进患者外周血白细胞雄激素受体基因表达的探讨[J]. *上海医学*, 2006, 29:245-246.  
[6] 邹俊杰,刘志民,商权,等. 人外周血白细胞雄激素受体基因表达的研究[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 22:636-638.  
[7] Tyagi R K, Lavrovsky Y, Ahn S C, et al. Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells[J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 14:1162-1174.  
[收稿日期] 2007-05-20 [修回日期] 2007-06-20  
[本文编辑] 尹茶

## 葡萄糖对 MG63 细胞株 TRAIL 表达的影响

周 玮,王加林\*,赵亚平,吴德平,惠亮亮,张 勇,顾 媛  
(解放军第 82 医院内分泌科,淮安 223001)

**[摘要]** **目的:**观察在不同浓度葡萄糖环境下人成骨肉瘤 MG63 细胞株肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)及其护骨素(OPG)、护骨素配体(OPGL)的表达,探讨糖尿病骨质疏松症的发病机制。**方法:**用不同浓度葡萄糖(5.5、16.7、33.3 mmol/L)分别刺激培养的 MG63 细胞 24 h,采用 RT-PCR 法检测 TRAIL、OPG、OPGL mRNA 的表达,以免疫组织化学法检测 MG63 细胞中 TRAIL 的表达及分布。**结果:**不同浓度葡萄糖环境的 MG63 细胞中 TRAIL、OPGL mRNA 的表达,均按照对照组、5.5 mmol/L 组、16.7 mmol/L 组、33.3 mmol/L 组的顺序递增( $P < 0.05$ ),OPG mRNA 的表达按照此顺序递减( $P < 0.05$ )。33.3 mmol/L 组 TRAIL mRNA 的水平明显高于对照组[(1.004±0.070) vs (0.740±0.023), $P < 0.05$ ],TRAIL 免疫反应阳性物质密度也明显高于对照组。**结论:**高糖环境可能导致成骨细胞中 TRAIL 和 OPGL 表达增多,OPG 表达减少。这可能是糖尿病骨质疏松症的重要发病机制之一。

**[关键词]** 糖尿病;骨质疏松;葡萄糖;MG63 细胞;肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体

**[中图分类号]** R 587.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)07-0771-03

### Effects of glucose on expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in MG63 cells

ZHOU Wei, WANG Jia-lin\*, ZHAO Ya-ping, WU De-ping, HUI Liang-liang, ZHANG Yong, GU Yuan (Department of Endocrinology, No. 82 Hospital of PLA, PLA Nanjing Military Area Command, Huaian 223001, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To observe the effects of different concentrations of glucose on the expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), osteoprotegerin (OPG), and the ligand of osteoprotegerin (OPGL) in osteosarcoma MG63 cells, so as to assess the role of glucose in pathogenesis of diabetic osteoporosis. **Methods:** MG63 cells were incubated with glucose at the concentrations of 5.5, 16.7, 33.3 mmol/L for 24 h. The expression of TRAIL, OPG and OPGL mRNA were examined by RT-PCR. Expression and distribution of TRAIL in MG63 cells were investigated by immunohistochemical method. **Results:** The mRNA expression of TRAIL and OPGL in MG63 cells increased in the order of control group, 5.5, 16.7, 33.3 mmol/L glucose groups ( $P < 0.05$ ), and the expression of OPG mRNA decreased in the same order ( $P < 0.05$ ). TRAIL mRNA level in 33.3 mmol/L glucose group was significantly higher than that in the control group [(1.004±0.070) vs (0.740±0.023),  $P < 0.05$ ] and the expression of TRAIL was stronger than that in the control group. **Conclusion:** High concentration of glucose can lead to increased expression of TRAIL and OPGL in osteoblasts and decreased expression of OPG, which may be one of the key pathogenetic factors of diabetic osteoporosis.

**[KEY WORDS]** diabetes mellitus; osteoporosis; glucose; MG63 cell; tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(7):771-774]

糖尿病对骨代谢的影响主要表现为骨吸收增加,骨形成减少与缓慢,使骨矿物质含量减少和骨质

**[作者简介]** 周 玮,硕士,主治医师. E-mail: ZW81107@126.com  
\* Corresponding author. E-mail: WJLDR@yahoo.com.cn

疏松<sup>[1]</sup>。但其确切的细胞发生机制尚未阐明。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是新发现的肿瘤坏死因子超家族的成员,可表达于人体的许多组织,对许多肿瘤来源的细胞具有很强的杀伤作用<sup>[2-3]</sup>,可介导病毒引起的凋亡<sup>[4-5]</sup>,并在一些自身免疫性疾病中起作用<sup>[6]</sup>。但 TRAIL 在糖尿病骨质疏松发病过程中是否起作用,目前少见报道。我们拟观察不同浓度葡萄糖环境下具有人成骨细胞表型特征的 MG63 细胞株中 TRAIL 及其护骨素(osteoprotegerin, OPG)、护骨素配体(osteoprotegerin ligand, OPGL)的表达情况,以进一步探讨糖尿病骨质疏松症的发病机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 第 106 代人成骨肉瘤 MG63 细胞株由中南大学湘雅二医院代谢内分泌研究所惠赠;MEM 培养液购自 Sigma 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所;牛血清白蛋白及 TRIzol 试剂盒购自 Gibco 公司;逆转录反应试剂盒购自 Promega 公司;PCR 扩增试剂盒和 DNA 梯度 marker 购自 TaKaRa 公司;PCR 引物由北京三博远志公司合成。鼠抗人 TRAIL 单克隆抗体购自第二军医大学基础部免疫学教研室;生物素标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自宝泰克公司;ABC 复合物购自华美生物工程公司;DAB 购自 Sigma 公司。

1.2 细胞培养 将第 106 代 MG63 细胞株,以  $5 \times 10^8$ /L 密度接种于培养瓶或制成单细胞悬液,接种于预先放置 4 张 7 mm  $\times$  22 mm 盖玻片的培养皿中,用含 10% 胎牛血清、50 mg/L 维生素 C 的无酚红 MEM 培养液,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,每 2 d 换液 1 次。

1.3 干预试验 接种于 50 ml 细胞培养瓶的 MG63 细胞达 60% ~ 70% 汇片,行细胞爬片的 MG63 细胞贴壁后,即分别换含 1 g/L 牛血清白蛋白的无血清 MEM 培养液培养 3 h,再分别用含不同浓度葡萄糖的 MEM 培养液干预,分为 4 组:(1)培养基对照组;(2)葡萄糖 5.5 mmol/L 组;(3)葡萄糖 16.7 mmol/L 组;(4)葡萄糖 33.3 mmol/L 组。干预 24 h 后,抽提细胞总 RNA 行 RT-PCR 检测,细胞制片行免疫组织化学检测。以上各组实验均独立重复 5 次。

1.4 RT-PCR TRIzol 抽提 MG63 细胞总 RNA。取 2  $\mu$ g 总 RNA,用逆转录试剂盒合成 cDNA,再取 1  $\mu$ l cDNA 行 PCR 扩增 OPG、OPGL、TRAIL 基因,以  $\beta$ -actin 基因为内对照。OPG 上游引物:5'-AGT GGG AGC AGA AGA CAT TG-3',下游引物:5'-ATT GGA CCT GGT TAC CTA TC-3',扩增长度为 268 bp;OPGL 上游引物:5'-GCG TCG CCC TGT TCT TCT AT-3',下游引物:5'-TTG GTG CTT CCT CCT TTC AT-3',扩增长度为 598 bp;TRAIL 上游引物:5'-GGC ATT CAT TCC TGA GCA ACT T-3',下游引物:5'-GAT CTC GTG ATC TAC CCA CCT T-3',扩增长度为 908 bp。反应体系为 25  $\mu$ l,双蒸水 18  $\mu$ l,10 $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ l, *Taq* 酶 0.5  $\mu$ l,上游引物各 2  $\mu$ l,下游引物各 2  $\mu$ l,模板 1  $\mu$ l。OPG 反应条件:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 15 s,72℃ 延伸 30 s 共 30 个循环,最后延伸 10 min。OPGL 反应条件:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 15 s,72℃ 延伸 40 s 共 30 个循环,最后延伸 10 min。TRAIL 反应条件:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,57℃ 退火 15 s,72℃ 延伸 60 s 共 30 个循环,最后延伸 10 min。分别取 10  $\mu$ l PCR 扩增产物于含 0.5 mmol/L 溴化乙锭的 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳并拍照,并用凝胶成像分析系统行条带光密度定量检测,以测得值与  $\beta$ -actin 光密度值的比值表示各指标的 mRNA 相对表达量。

1.5 免疫组织化学实验 细胞爬片经 40 g/L 甲醛固定后,经二甲苯、无水乙醇常规脱水。用 0.5% 甲醇-双氧水室温作用 30 min,以封闭内源性过氧化物酶。滴加鼠抗人 TRAIL 单克隆抗体(稀释度为 1:200)于 4℃ 过夜。加生物素标记的羊抗鼠 IgG 抗体(稀释度为 1:100)室温孵育 2 h。以上各步骤之间均用 PBS (pH 7.3) 振洗 5 min  $\times$  4 次。加 ABC 复合物(稀释度为 1:200)室温孵育 1 h。DAB (含 DAB 5.0 mg, PBS 40 ml 和 30% 双氧水 40  $\mu$ l) 显色 10~20 min。脱水、透明及 DPX 封片。观察及记录结果。采用 Olympus BH-2 光学显微镜观察并摄片。以正常羊血清及 PBS 代替一抗染色,作为阴性和空白对照。

1.6 统计学处理 用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析。方差齐性数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD-*t* 检验,方差不齐

数据用中位数(四分位数间距)[M(QR)]表示,采用秩和检验,组间两两比较用 Nemenyi 法检验。

## 2 结果

2.1 葡萄糖对 MG63 细胞 TRAIL、OPG 及 OPGL mRNA 表达的影响 RT-PCR 半定量结果显示,葡萄糖能上调 MG63 细胞中 TRAIL mRNA 的表达。16.7 mmol/L 的葡萄糖即可出现上调作用,并在 33.3 mmol/L 时这种上调作用更明显( $P < 0.05$ )。高葡萄糖能下调 MG63 细胞中 OPG mRNA 的表达,与对照组和 5.5 mmol/L 葡萄糖组相比,16.7 mmol/L 的葡萄糖即可降低 OPG mRNA 表达,并在 33.3 mmol/L 时这种下调作用更明显( $P < 0.05$ , 表 1)。葡萄糖还能上调 MG63 细胞中 OPGL mRNA 的表达,对照组、5.5 mmol/L、16.7 mmol/L、33.3 mmol/L 葡萄糖组,OPGL mRNA 光密度值的中位数(四分位数间距)[M(QR)]分别为 0.107 (0.008)、0.114 (0.015)、0.206 (0.040)、0.234 (0.037), 33.3 mmol/L 组的 OPGL mRNA 表达明

显高于对照组( $P < 0.05$ )。

2.2 葡萄糖对 MG63 细胞 TRAIL 免疫组织化学染色的影响 TRAIL 免疫反应阳性细胞多呈梭形,少数呈不规则形。阳性物质呈棕黄色颗粒,位于胞质内,胞核阴性。在培养基对照组(图 1A)及 5.5 mmol/L 组(图 1B)中,TRAIL 免疫反应产物呈阴性或弱阳性。在高浓度葡萄糖组中,TRAIL 免疫反应阳性物质密度明显增高(图 1C、1D)。

表 1 不同浓度葡萄糖对 MG63 细胞 TRAIL、OPG mRNA 表达的影响

(n=5, $\bar{x} \pm s$ )		
组 别	OPG	TRAIL
对照组	0.961 ± 0.028	0.740 ± 0.023
葡萄糖( $c_B$ /mmol · L <sup>-1</sup> )		
5.5	0.960 ± 0.013	0.781 ± 0.023
16.7	0.919 ± 0.019 *△	0.884 ± 0.035 *△
33.3	0.907 ± 0.014 *△	1.004 ± 0.070 *△▲

\*  $P < 0.05$  与对照组比较;△  $P < 0.05$  与 5.5 mmol/L 葡萄糖组比较;▲  $P < 0.05$  与 16.7 mmol/L 葡萄糖组比较

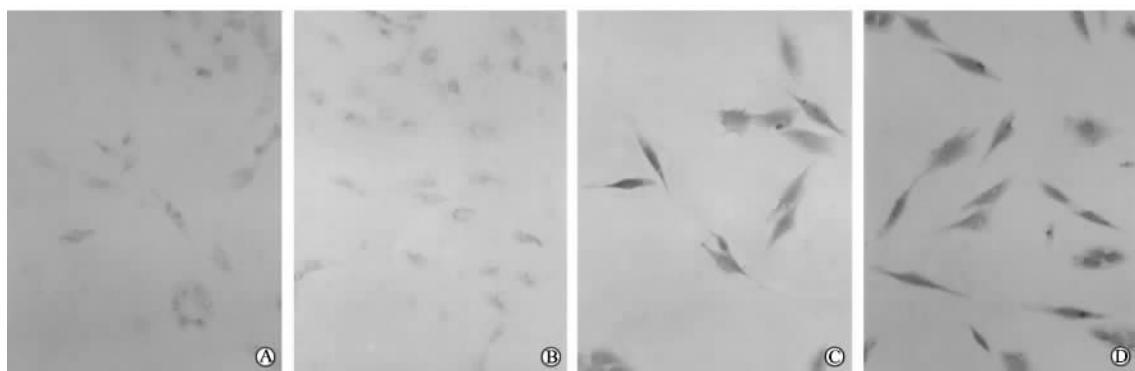


图 1 不同浓度葡萄糖对 MG63 细胞 TRAIL 免疫反应产物的影响(SABC, ×200)

A: 对照组; B: 5.5 mmol/L 葡萄糖组; C: 16.7 mmol/L 葡萄糖组; D: 33.3 mmol/L 葡萄糖组

## 3 讨论

骨质疏松与遗传有关,是破骨细胞(OC)和成骨细胞(OB)之间活性不平衡的结果。且动物实验表明在糖尿病大鼠病程早期即表现为成骨细胞数下降、破骨细胞数上升,说明骨形成减少,骨吸收相对大于骨形成<sup>[7]</sup>。糖尿病对骨代谢的影响主要表现为骨吸收增加,骨形成减少与缓慢,骨吸收过程大于骨形成过程,使骨矿物质含量减少和骨质疏松。其发病机制较为复杂,既往研究发现,其发病与胰岛素或胰岛素样生长因子-1 缺乏、持续高糖状态、高级糖基

化终末产物增多及糖尿病并发症等有关,但其确切的细胞机制尚未阐明。

TRAIL 是新发现的肿瘤坏死因子超家族的凋亡分子,在胎儿和成人的许多正常组织中都有 TRAIL mRNA 的表达。TRAIL 是一种能与多种受体结合,发挥诱导或抗凋亡作用的细胞因子。TRAIL 有 5 个受体:死亡受体(DR4, DR5)、诱骗受体(DcR1, DcR2)和分泌型受体 OPG。TRAIL 与 DR4、DR5 相互作用,诱导许多组织来源的肿瘤细胞株迅速凋亡,但不能诱导正常细胞凋亡。TRAIL 的两个诱骗受体 DcR1 缺乏死亡功能区, DcR2 只含有

死亡功能区的1/3,因而不能介导凋亡,但是可以抑制DR4、DR5介导的凋亡<sup>[8]</sup>。OPG是一个分泌型的TNF受体,是骨代谢的一个重要的负调控因子,能抑制OC生成、活化,减少骨吸收<sup>[9-11]</sup>,增加骨密度的作用。它主要通过中和性结合OPGL发挥骨保护作用,后者是诱导OC生成的关键性细胞因子,通过作用于OC上的受体RANK刺激OC形成、分化及活化,增强骨吸收。OPG竞争性结合OPGL,阻断OPGL与其靶信号受体RANK的结合,抑制OPGL/RANK对破骨细胞信号转导的活化,减少OC生成,发挥抗骨质疏松作用。OPG还能通过与TRAIL的竞争性结合,抑制TRAIL和死亡受体结合,来抑制TRAIL诱导细胞凋亡的作用。反之,TRAIL可结合OPG,并相互中和对方的功能<sup>[9]</sup>,即可间接解除OPG对OPGL的结合,抑制它的抑制破骨细胞的发生和增加骨密度的作用。可见OPG和TRAIL是相互抑制的。

我们从基因水平观察了不同浓度葡萄糖对MG63细胞株中OPG、OPGL表达的影响。发现高糖能使OPGL mRNA表达增加,呈剂量依赖性,糖浓度越高,OPGL mRNA的表达越高。高糖同时能抑制MG63细胞中OPG mRNA的表达,使细胞内OPG/OPGL比值降低,提示高糖对成骨细胞中OPG/OPGL水平的调节,可能是糖尿病导致骨质疏松症的机制之一,高糖引起OPG/OPGL比值失调,导致骨质疏松。我们从基因及免疫组织化学的角度还观察到,不同浓度葡萄糖对MG63细胞株TRAIL表达有影响,发现随着葡萄糖浓度的升高,TRAIL mRNA表达增多。TRAIL分布于胞质内,高糖环境可导致TRAIL免疫反应阳性物质明显增多。TRAIL是与细胞凋亡有关的细胞因子,这提示了高浓度的葡萄糖可能是通过TRAIL以自分泌或旁分泌的形式介导OB的凋亡,从而调节OB的数量,导致骨形成减少,骨质疏松的发生。另一方面,高糖环境下TRAIL表达的增多,可竞争性结合OPG,阻断后者对OPGL的结合,促进了OC数目的增多及分

化成熟。关于TRAIL的死亡受体和诱骗受体在糖尿病骨质疏松症发病中的变化情况,有待于进一步的研究。

#### [参考文献]

- [1] 廖二元,超楚生,伍汉文. 内分泌学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:1818-1819.
  - [2] Morrison B, Tang Z, Jacobs B, et al. Apo2L/TRAIL induction and nuclear translocation of inositol hexakisphosphate kinase 2 during IFN- $\beta$ -induced apoptosis in ovarian carcinoma[J]. *Biochem J*, 2005, 385(Pt 2):595-603.
  - [3] 成诗银,张惠中,陈剑秋,等. 肿瘤细胞内特异表达TRAIL载体的构建及其在喉癌细胞株Hepa2中的表达[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26:1108-1111.
  - [4] Matsuda T, Almasan A, Tomita M, et al. Resistance to Apo2L ligand (Apo2L)/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis and constitutive expression of apo2L/TRAIL in human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines [J]. *J Virol*, 2005, 79:1367-1378.
  - [5] Ishikawa E, Nakazawa M, Yoshinari M, et al. Role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune response to influenza virus infection in mice[J]. *J Virol*, 2005, 79:7658-7663.
  - [6] 付建芳,姬秋和,黄威权,等. 桥本甲状腺炎中TRAIL及其死亡受体DR4, DR5的表达[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23:920-923.
  - [7] Naoshi O, Daichi C, Naoto K, et al. Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover[J]. *J Clin Invest*, 2000, 105:935-943.
  - [8] Sanlioglu A D, Dirice E, Aydin C, et al. Surface TRAIL decoy receptor-4 expression is correlated with TRAIL resistance in MCF7 breast cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2005, 5:54.
  - [9] Pritzker L B, Scatena M, Giachelli C M. The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival[J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15:2834-2841.
  - [10] Bell N H. RANK ligand and the regulation of skeletal remodeling[J]. *J Clin Invest*, 2003, 111:1120-1122.
  - [11] Hofbauer L C, Khosla S, Dunstan C R, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption[J]. *J Bone Miner Res*, 2000, 15:2-12.
- [收稿日期] 2007-05-20 [修回日期] 2007-06-20  
[本文编辑] 尹 茶