

四环素-哌嗪雌酚酮上调骺板 *c-fos*, *c-jun* 的 mRNA 及其表达产物水平

郑 虎, 李灵芝*, 翁玲玲**

(华西医科大学药学院, 成都 610041)

摘要 目的: 研究四环素-哌嗪雌酚酮(XW630)对软骨细胞 *c-fos* 和 *c-jun* 基因的 mRNA 及其表达产物水平的影响, 初步探讨其对骨的作用机制。方法: 用原位杂交法, 测定体外培养小鼠胚胎长骨骺板 *c-fos* 和 *c-jun* mRNA 的水平, 同时用免疫组织化学法, 测定了相应的表达产物。结果: 10^{-7} mol·L⁻¹ XW630 可显著上调骺板静止区、增殖区和肥大区 *c-fos* 和 *c-jun* 的 mRNA 及其表达产物水平, 且其作用比雌酚酮强。结论: XW630 可能通过上调软骨细胞 *c-fos*, *c-jun* 的表达, 促进软骨细胞中含有 AP-1 位点的、与骨生长发育有关的基因表达, 从而促进软骨内骨形成。

关键词 四环素-哌嗪雌酚酮; 雌酚酮; 原位杂交; 免疫组织化学

四环素-哌嗪雌酚酮(XW630)化学名为 2-(3-雌酚-N-乙基哌嗪甲基)四环素, 是新型的骨定向雌激素, 可通过四环素的强趋骨性富集于骨组织。其促进去卵巢大鼠骨形成作用明显优于雌酚酮^[1,2], 而对子宫的雌激素活性仅为雌酚酮的 1/1960^[3], 因此在开发疗效高、副作用小的抗骨质疏松新药中, 他是值得关注的一类化合物。*c-fos*, *c-jun* 与骨生长密切相关, 资料显示雌二醇可快速调节培养破骨细胞 *c-fos*, *c-jun* 的 mRNA 水平^[4], 提示骨中 *c-fos* 和 *c-jun* 表达的改变很可能是骨细胞对雌激素的最初反应。本文用小鼠胚胎长骨培养模型, 观察 XW630 对骺板 *c-fos* 和 *c-jun* 的 mRNA 及其表达产物的影响, 初步探讨其对骨的作用机制。

材 料 和 方 法

药品及试剂 雌酚酮、XW630 由本院骨质疏松症药物研究室合成。培养基 BGJ, Hepes, 胎牛血清、胃蛋白酶、聚蔗糖、牛血清白蛋白(BSA)、焦碳酸二乙酯(DEPC)、甘氨酸、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)均购自美国 Sigma 公司; 兔抗人 *c-fos* 多克隆抗体和兔抗小鼠 *c-jun* 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 兔 SPTM 试剂盒(含生物素化羊抗兔 IgG)购自美国 Zymed 公司; 二氨基联苯胺盐酸盐(DAB)购自丹麦

DAKO 公司; 地高辛 DNA 标记和检测试剂盒、变性鲑精 DNA 购自德国 Boehringer Mannheim 公司; 硝基蓝四氮唑(NBT)、5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸(BCIP)、*c-fos* cDNA 探针(1.3 kb)和 *c-jun* cDNA 探针(0.7 kb)购自中山公司; 蛋白酶 K、十二烷基硫酸钠(SDS)、去离子甲酰胺购自美国 GIBCO-BRL 公司。

仪器 Olympus 解剖显微镜和 Olympus 光学显微镜(日本), 组织切片器(AO, 美国); 低温冰箱(-80℃, -30℃: Sanyo, 日本); 恒冷切片器(Bright, 英国); UV-260 型紫外分光光度计(Shimadzu, 日本); 真彩色图像分析系统(THW-500 型, 四川联合大学图像研究所)。

实验分组 实验分为正常对照组(control)、雌酚酮组(estrone)和 XW630 组。每组培养小鼠胚胎长骨 6 根, 重复 3 次。

骨组织培养^[5]与处理 将怀孕 16 d 的昆明种小鼠脱颈椎处死, 取雌性胎鼠剥离出长骨于 BGJb 培养基中旋转培养。雌酚酮组和 XW630 组给药浓度均为 10^{-7} mol·L⁻¹。

用于免疫组织化学染色的骨组织, 在培养 48 h 后用 4% 甲醛(pH 7.2)固定, 7% EDTA(pH 7.2, 4℃)脱钙, 其间每天更换 EDTA 一次, 16 d 后, 用双蒸水漂洗, 石蜡包埋, 自中心纵切片(5 μm)。

用于原位杂交的骨组织, 培养 48 h 后用 4% 甲醛(含 0.3% 苦味酸, pH 7.4, 4℃)固定 4~6 h, 再加 30% 蔗糖(4% 多聚甲醛配制, pH 7.4)过夜, 恒冷箱冰冻切片(纵切, 20 μm)。

***c-fos* 和 *c-jun* 蛋白免疫组织化学染色** 组织切片按常规方法脱蜡、入水, 分别加兔抗人 *c-fos* 多克

收稿日期: 1999-06-21

基金项目: 国家自然科学基金重点项目资助课题(39430120)

* 现址: 武警医学院药理学教研室, 天津 300162;

Tel: (022) 24372788-78455

** 联系人 Tel: (028) 5501613, Fax: (028) 5501609

隆抗体、兔抗小鼠 *c-jun* 多克隆抗体 (工作浓度 1: 200), 37 °C 下孵育 2 h; 加生物素化羊抗兔 IgG (工作浓度 1: 200), 37 °C 下孵育 1 h; 加 SP 复合物 (1: 300), 37 °C 下孵育 1 h; DAB 显色, 脱水、透明、封片。

C-fos, *c-jun* 原位杂交^[6] 地高辛随机引物法标记探针, 按试剂盒说明操作。紫外分光光度法测得被标记 *c-fos* cDNA 和 *c-jun* cDNA 探针浓度分别为 14 μg·mL⁻¹ 和 13 μg·mL⁻¹。

用标记探针进行杂交, 杂交前将探针 95 °C 变性 10 min, 杂交液探针浓度为 0.5 g·mL⁻¹, 45 °C 下杂交 24 h。碱性磷酸酶-NBT-BCIP 显色系统 37 °C 显色 30 min, 脱水、透明、封片。

图像分析及统计方法 图像分析系统下分别测定骺板静止区、增殖区和肥大区阳性细胞面积和/或阳性细胞数。切片放大倍数为 40 倍, 测量窗面积 100 μm²。

所有数据均进行方差分析和 *q* 检验, 测定差异显著性。

结 果

1 XW630 对骺板 *c-fos* mRNA 和 *c-jun* mRNA 的影响

培养 48 h 后, 光镜下见正常对照组骺板静止区、增殖区和肥大区均有 *c-fos* 和 *c-jun* mRNA 低水平表达, 阳性物质位于细胞浆, 依表达强度不同其阳性物质可分别呈蓝色或蓝紫色颗粒状。经 XW630 处理后, 增殖区 *c-fos* mRNA 阳性细胞数显著高于对照组和雌酚酮组 (*P* < 0.01), 肥大区高于对照组 (*P* < 0.05), 与雌酚酮组无统计学差异。静止区、增殖区和肥大区 *c-jun* mRNA 阳性细胞数均显著高于对照组 (*P* < 0.01), 与雌酚酮组相比无统计学差异。

2 XW630 对骺板 *c-fos* 和 *c-jun* 蛋白含量的影响

正常对照组免疫组织化学染色切片中, 骺板 3 区均可见 *c-fos* 和 *c-jun* 蛋白免疫反应阳性软骨细胞, 阳性物质位于细胞核, 呈棕色颗粒状。经 XW630 处理后, 表达程度发生了变化。增殖区 *c-fos* 蛋白免疫反应阳性细胞数显著高于正常对照组和雌酚酮组, 增殖区和肥大区 *c-jun* 蛋白免疫反应阳性细胞数分别显著高于和高于对照组。XW630 对骺板 *c-fos* 和 *c-jun* 蛋白免疫组织化学染色阳性细胞总面积的影响分别见表 1 和表 2。由表 1 可见: 培养基中加入 10⁻⁷ mol·L⁻¹ XW630 培养 48 h 后, 骺

板增殖区和肥大区 *c-fos* 蛋白免疫组织化学染色阳性细胞面积均显著高于对照组和雌酚酮组, 静止区 *c-fos* 蛋白阳性细胞面积与对照组和雌酚酮组无差异。由表 2 可见: 经 10⁻⁷ mol·L⁻¹ XW630 处理后, 骺板各区 *c-jun* 蛋白免疫组织化学染色阳性细胞面积均显著高于对照组和雌酚酮组。

Tab 1 Effects of XW630 on total area of positive cells of *c-fos* protein immunohistochemical stain in epiphyseal plate (μm²/100 μm² section)

Group	Resting zone	Proliferative zone	Hypertrophic zone
Control	8.15 ± 0.18	8.24 ± 0.13	7.40 ± 0.17
Estrone	9.54 ± 0.27	13.05 ± 0.18 ^{**}	9.78 ± 0.10 ^{**}
XW630	9.26 ± 0.24	14.21 ± 0.45 ^{**△△}	13.46 ± 0.47 ^{**△△}

The long bones of female mice of 16 days were cultured for 48 h in BGJb medium treated with 10⁻⁷ mol·L⁻¹ estrone or 10⁻⁷ mol·L⁻¹ XW630 and same volume vehicle solution were added to the control. Every treatment group within an experiment consisted of six bones. The bones were decalcified in EDTA and embedded in paraffin wax. Midlongitudinal 5 μm thick sections were used for immunohistochemical stain for analysis of *c-fos* protein (SP method). The total area of positive cells of *c-fos* protein in epiphyseal plates were determined. $\bar{x} \pm s$, *n* = 6. ^{**} *P* < 0.01 compared with control, ^{△△} *P* < 0.01 compared with estrone.

Tab 2 Effects of XW630 on total area of positive cells of *c-jun* protein immunohistochemical stain in epiphyseal plate (μm²/100 μm² section)

Group	Resting zone	Proliferative zone	Hypertrophic zone
Control	12.02 ± 0.50	12.19 ± 0.33	8.20 ± 0.62
Estrone	20.20 ± 0.22 ^{**}	19.27 ± 0.31 ^{**}	13.24 ± 0.57 ^{**}
XW630	25.34 ± 0.87 ^{**△△}	22.61 ± 0.64 ^{**△△}	14.75 ± 0.42 ^{**△△}

The long bones of female mice of 16 days were cultured for 48 h in BGJb medium treated with 10⁻⁷ mol·L⁻¹ estrone or 10⁻⁷ mol·L⁻¹ XW630 and same volume vehicle solution were added to the control. Every treatment group within an experiment consisted of six bones. The bones were decalcified in EDTA and embedded in paraffin wax. Midlongitudinal 5 μm thick sections were used for immunohistochemical stain for analysis of *c-jun* protein (SP method). The total area of positive cells of *c-jun* protein in epiphyseal plates were determined. $\bar{x} \pm s$, *n* = 6. ^{**} *P* < 0.01 compared with control, ^{△△} *P* < 0.01 compared with estrone.

讨 论

C-fos 和 *c-jun* 是调控细胞分化和发育的立即早期基因, 其基因产物直接与成骨细胞^[7,8]和破骨细胞^[4]的分化、成熟及功能密切相关。Fos 蛋白和 Jun 蛋白是 AP-1 (activator protein 1) 转录因子复合物

的组成成分,正常情况下,在大多数细胞内有低水平表达,本文结果也证实正常对照组软骨细胞中均有 $c-fos$ 和 $c-jun$ mRNA 及其表达产物。在软骨内成骨过程中, $c-fos$ 表达与软骨细胞向成骨细胞分化有关^[9]。

雌激素与受体结合后,可经 Fos-Jun 形成的 AP-1 转录因子介导调控下游基因的表达^[10]。软骨细胞存在雌激素受体^[11],因此雌激素可通过受体介导直接作用于软骨细胞。雌激素对软骨细胞 $c-fos$ 和 $c-jun$ 表达的影响尚未见文献报道,但由软骨细胞和成骨细胞分泌的、与软骨内成骨及骨重建密切相关的转化生长因子- β (TGF- β)、胰岛素样生长因子-I,II(IGF-I,IGF-II)基因序列中均含有 AP-1 结合位点,且其表达可被雌二醇调控^[12-14]。此外,雌二醇还可影响破骨细胞 $c-fos$ 和 $c-jun$ 的 mRNA 水平,提示雌激素对骨及软骨发育的影响可能与其对骨组织 $c-fos$ 和 $c-jun$ 表达的影响有关。本文实验结果表明 XW630 在体外能不同程度地上调骺板软骨静止区、增殖区和肥大区 $c-fos$ 和 $c-jun$ 的 mRNA 及其表达产物水平,我们推测该化合物作用于骨的机制之一可能是其分子中的雌酚酮与软骨细胞浆内的雌激素受体结合后,诱导 $c-fos$ 和 $c-jun$ 快速转录,通过促进软骨内成骨过程而促进了骨生长。关于 $c-fos$ 和 $c-jun$ 表达后是否通过引起下游基因如 TGF- β ,IGF-I,IGF-II 的表达而促进骨生长,尚需进一步实验证实。

实验结果表明: XW630 对 $c-fos$ mRNA 以及 $c-fos$ 和 $c-jun$ 蛋白水平与雌酚酮相比均明显上调,表明雌酚酮与四环素偶联后对这两个基因表达的影响增强,这可能与四环素的骨定向作用有关,也可能是由于 XW630 本身的分子结构不同于雌酚酮,其立体构象的变化改变了化合物与不同雌激素受体亚型的结合能力或结合位点,尚有待于进一步研究证实。

致谢 本工作得到本校法学院博士生陈永亮及公共卫生学院博士生马丽英的协助。

参 考 文 献

- Zheng H, Weng LL. Bone resorption inhibition/osteogenesis promotion pharmaceutical composition. *US Patent*, 5698542,1997
- 郑虎,翁玲玲. 可用作带有雌激素结构的骨靶向药物的化合物. 中国专利. ZL94111687.5.1997
- 莫正纪,焦秀香,苏怀德,等. 骨靶向新化合物四环素-哌嗪雌酚酮的雌激素活性测定. *药理学报*, 1998, **33**: 645
- Oursler MJ, Osdoby P, Pufferoen J, et al. Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 6613
- 马丽英,王瑞淑,李云,等. 小鼠胚胎长骨体外培养的研究. *卫生研究*, 1998, **27**: 399
- 苏慧慧. 原位杂交. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 59 ~ 158
- McCabe LR, Banerjee C, Harrospm RJ, et al. Developmental expression and activities of specific Fos and Jun proteins are functionally related to osteoblast maturation: role of Fra-2 and Jun D during differentiation. *Endocrinology*, 1996, **137**: 4398
- McCabe LR, Kockx M, Lian J, et al. Selective expression of fos- and jun-related genes during osteoblast proliferation and differentiation. *Exp Cell Res*, 1995, **218**: 255
- Ruther U, Garber C, Komitowski D, et al. Deregulated $c-fos$ expression interferes with normal bone development in transgenic mice. *Nature*, 1987, **325**: 412
- Peach K, Webb P, Kuiper GGJM, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP-1 sites. *Science*, 1997, **277**: 1508
- Dayani N, Corvol MT, Robel P, et al. Estrogen receptors in cultured rabbit articular chondrocytes: influence of age. *J Steroid Biochem*, 1988, **31**: 351
- Umayahara Y, Kawamori R, Watada H, et al. Estrogen regulation of the insulin-like growth I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J Bio Chem*, 1994, **269**: 16433
- Ikeda T, Shigeno C, Ryuichi K, et al. Ovariectomy decreases the mRNA levels of the transforming growth factor- β_1 and increases the mRNA levels of osteocalcin in rat bone *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **3**: 1228
- Kassem M, Okazaki R, Harris SA, et al. Estrogen effects on insulin-like growth factor gene expression in a human osteoblastic cell line with high levels of estrogen receptor. *Calcif Tissue Int*, 1998, **62**: 60

EFFECTS OF 2-(3-ESTRONE *N*-ETHYL-PIPERAZINE METHYL) TETRACYCLINE ON THE LEVELS OF C-FOS AND C-JUN mRNAs AND THEIR PRODUCT PROTEINS IN EPIPHYSEAL PLATE

Zheng Hu, Li Lingzhi and Weng Lingling

(West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041)

ABSTRACT **AIM:** 2-(3-Estrone *N*-ethyl-piperazine-methyl) tetracycline (XW630) is a novel bone-targeted estrogen which shows stronger action in enhancing bone formation than estrone on ovariectomized rats while shows weaker estrogen-like activity on mouse uterus. Therefore, it may be a potential compound for prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. The effects of XW630 on the levels of c-fos and c-jun mRNAs and their product proteins in long bone were studied for insight into the mechanism by which XW630 acts on bone. **METHODS:** The long bones of fetal mice of 16 days old were cultured in BGJb medium and treated with 10^{-7} mol·L⁻¹ XW630 or 10^{-7} mol·L⁻¹ estrone. After cultured for 48 h, the levels of mRNAs of c-fos and c-jun were determined by approach of *in situ* hybridization. Immunohistochemical analysis of c-fos protein and c-jun protein were also performed. **RESULTS:** The levels of c-fos mRNA, c-jun mRNA and their proteins in resting zone, proliferative zone and hypertrophic zone were all upregulated. XW630 showed stronger effects on epiphyseal plate than estrone. **CONCLUSION:** The results suggest the possibility that XW630 enhanced endochondral bone development by upregulating the expression of c-fos and c-jun in epiphyseal plate. Their proteins may in turn rapidly regulate expressions of other genes that relate to bone growth and in which there are AP-1 sites.

KEY WORDS 2-(3-estrone *N*-ethyl-piperazine-methyl) tetracycline (XW630); estrone; *in situ* hybridization; immunohistochemistry