

17 β -雌二醇抑制高同型半胱氨酸诱导破骨 细胞 Raw 264.7 激活的作用研究^{* 1}

何颖¹, 陈学秋², 宗一¹, 詹东¹, 杨萍¹, 刘世昌¹, 陆地¹, 桂莉³

(1. 昆明医学院 人体解剖学教研室, 云南昆明 650500; 2. 云南省中医学院 人体解剖学教研室, 云南昆明 650500;
3. 云南省第三人民医院 内分泌科, 云南昆明 650000)

摘要:探讨 17- β 雌二醇 (17 β -Estradiol, 17 β -E₂) 对高同型半胱氨酸 (High Homocystine, HHcy) 诱导的破骨前体细胞株 Raw 264.7 炎症因子释放的抑制作用. 用同型半胱氨酸 (Homocystine, Hcy) 刺激 Raw264.7 细胞构建炎症模型, 采用四甲基偶氮唑蓝比色法 (MTT) 检测 17 β -E₂ 对 Raw 264.7 细胞的活力影响, 免疫荧光双标和 RT-PCR 方法检测不同浓度 17 β -E₂ (1, 10 nmol/L 和 1 μ mol/L) 对环氧合酶-2 (COX-2) 和细胞炎性蛋白酶诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、细胞炎性因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白介素-1 β (IL-1 β)、炎性信号蛋白核因子- κ B (NF- κ B) 蛋白与 mRNA 的表达变化. 结果发现: 不同浓度的 17 β -E₂ 在翻译水平和转录水平上明显抑制了 Hcy 诱导的细胞炎性蛋白酶 COX-2 和 iNOS, 细胞炎性因子 TNF- α 和 IL-1 β 与炎性信号蛋白 NF- κ B 的上调, 并且 COX-2 和 IL-1 β 蛋白和 mRNA 的表达呈剂量依赖性. 上述结果表明 17 β -E₂ 可通过调控 Hcy 诱导的破骨前体细胞株 Raw264.7 细胞炎性因子释放从而抑制破骨激活, 发挥抗骨质疏松的作用.

关键词: 17 β -雌二醇; 同型半胱氨酸; 炎症因子; Raw 264.7 细胞; 逆转录 PCR

中图分类号: Q 591.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2011)06-0716-07

骨质疏松是一个很重要的公共卫生问题, 引起很高的发病率和死亡率^[1-3]. 骨质疏松症 (Osteoporosis, OP) 是以骨量减少、骨的微观结构改变为特征, 致使骨的脆性增加以及易于发生骨折的一种全身性疾病^[4]. 近年来, 有大量文献报道提出了多种发病机制学说, OP 的发病机制研究方面取得了很大的进展. 大量研究提出, 人体血浆同型半胱氨酸 (Homocystine, Hcy) 浓度升高可促进骨质疏松的发生, 并已成为引起老年骨质疏松症的一个独立的危险因素, 引起了很多国内外学者的关注^[5-6]. 前不久有 2 项分别进行的且已经被发表的流行病学研究调查了 Hcy 在正常范围内变异与骨质疏松性骨折直接的关系. 初期的研究结果显示, Hcy 在骨的

新陈代谢中起重要作用, 如对破骨前体细胞 Raw 264.7 的激活^[7]. 高 Hcy 者容易骨折的原因可能就是 Hcy 阻碍骨胶原这种纤维状蛋白质形成网状结构的作用^[8].

破骨细胞是一种多核巨细胞, 其来源于骨髓单核巨噬细胞系, 是人体生理性骨重建和病理性骨破坏过程中高度特异性且唯一具有骨质吸收功能的细胞. 破骨细胞的主要功能为吸收骨, 能在骨的发育、形成、吸收及骨量的调节方面起关键作用. 其骨吸收过程是通过多种因素的调控及复杂的分子机制完成的^[9]. 17- β 雌二醇 (17 β -Estradiol, 17 β -E₂) 作为一种临床治疗绝经后骨质疏松症的有效药物, 其主要机制是通过促进成骨细胞增殖, 抑

* 收稿日期: 2011-07-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30860336; 30560170); 云南省科技厅-昆明医学院联合资助项目 (2008CD016, 2010CD156; 2011CD041); 云南省应用基础研究重点资助项目 (2008CC007); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才培养资助项目 (2009CI033); 昆明医学院研究生创新基金资助项目 (2011J01).

作者简介: 何颖 (1985-), 女, 湖南人, 硕士生, 主要从事神经解剖学方面的研究.

通讯作者: 桂莉 (1970-), 女, 云南人, 硕士生导师, 主任医师, 主要从事内分泌学临床、科研工作, E-mail: guili0527@126.com.

制破骨细胞活化^[10-11]而抑制 OP 的发展,但长期应用亦能产生明显的副作用^[12]. 本实验室前期的实验已经证明 17 β -E₂ 呈剂量依赖性促进成骨细胞 MG63 的增殖并已研究其分子机制,但在其对破骨细胞的作用及分子机制现在仍无明确报道,而破骨前体细胞 Raw 264.7 是经典的具有破骨细胞表型特征的破骨细胞模型,本文拟通过 Hcy 刺激破骨前体细胞株 Raw 264.7 建立体外骨质疏松模型^[13],使用免疫荧光双标技术和 RT-PCR 方法检测相关细胞炎性蛋白酶(iNOS 和 COX-2)和促炎细胞因子(TNF- α 和 IL-1 β)的表达有何变化,探讨 17 β -E₂ 在 Hcy 诱导的 Raw 264.7 细胞激活中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 Raw264.7 细胞株由南方医科大学细胞生物学教研室白晓春教授捐赠,无酚红 DMEM 高糖培养基、DMEM 高糖培养基和胎牛血清购买于美国 HyClone 公司,Hcy 购买于美国 Sigma 公司,鼠单克隆抗体 iNOS 及 COX-2、兔多克隆抗体 TNF- α ,IL-1 β 及 NF- κ B,二抗 TRITC 荧光标记山羊抗小鼠及 TRITC 荧光标记山羊抗兔与 DAPI 核染料购买于美国 Santa Cruz 公司,引物合成及 Trizol[®] RNA 提取试剂盒和 cDNA 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,四甲基偶氮唑盐(MTT)购于北京普利莱基因技术有限公司,17- β E₂ 购自美国 Sigma 公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Raw264.7 细胞复苏后,置于含 10% 胎牛血清及 0.1% 双抗的 DMEM 高糖完全培养基中,在细胞培养箱(37 $^{\circ}$ C,5% CO₂)中进行培养,2~3 d 细胞换液 1 次,3~4 d 细胞基本可铺满,贴壁完好,即可传代 1 次.在倒置显微镜下观察,细胞与标准细胞形态相符,且在培养过程中,其特性如不易消化、生长速度较快等均与标准细胞相符.取对数生长期细胞进行实验.细胞分组处理前须用无酚红的 DMEM 高糖培养基中饥饿处理 6 h.

1.2.2 细胞活性测定 将 Raw 264.7 细胞用 1% 胰酶加 0.02% EDTA 消化,悬液接种至 96 孔板中,密度约为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,培养 24 h,至细胞贴壁且生长状况良好后随机分为空白对照组、模型组和 17 β -E₂ 处理组,每组设 5 个重复组.其中处理组预处理不同浓度的 17 β -E₂ (1, 10 nmol/L 和 1

$\mu\text{mol/L}$)1 h 后加 Hcy (5 mmol/L)刺激 1 h,模型组为单独 Hcy (5 mmol/L)刺激 1 h,处理完毕各组每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 50 μL ,置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养 2 h,将培养基倒弃,加入 150 μL DMSO,水平摇床上振荡 5~10 min,直至紫红色结晶颗粒完全溶解,使用酶标仪在 540 nm/L 处检测各组细胞吸光度(540 nm 处),细胞存活率的计算方法为:(实验组吸光度-空白组吸光度)/(阴性对照组吸光度-空白组吸光度) \times 100%. 每组实验至少重复 3 次^[14].

1.2.3 免疫荧光双标检测 将 4% 多聚甲醛分别加入至不同处理的各组细胞中固定 15 min,PBST 漂洗 3 次,每次 5 min,10% 山羊血清室温下封闭 1 h,加鼠单克隆抗体 iNOS,COX-2,兔多克隆抗体 TNF- α ,IL-1 β ,NF- κ B/P65 (以上抗体均为 1:500 稀释),4 $^{\circ}$ C 过夜.漂洗 3 次,每次 5 min,加入含 TRITC 标记的相应 IgG 二抗、TRITC 偶联荧光标记山羊抗鼠 IgG 二抗 (均为 1:100 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h.用 TBST 漂洗 3 次,每次 5 min,在暗室内以室温晾干玻片,用 DAPI (1:1 000 稀释)封片,室温下晾干,于荧光显微镜 (Nikon,D80i,Tokyo) 下观察、摄片,曝光时间分别为 2 ms (UV 激发光下摄片) 及 300 ms (TRITC 激发光下摄片). 每组实验至少重复 3 次.

1.2.4 RT-PCR 检测 将各组不同处理的细胞,用 Trizol[®] RNA 试剂盒提取总 RNA,以此总 RNA 按照 cDNA 试剂盒步骤转录 cDNA 后,以其为模板进行 PCR 反应扩增目的片段,此反应采用 $2 \times \text{Taq PCR MasterMix}$ 试剂进行.整个 PCR 的反应体系含有:各 1 μL 上下游引物,2 μL cDNA,12.5 μL $2 \times \text{Taq PCR MasterMix}$,8.5 μL Nuclease free 水.使用引物设计软件 (Primer 3 软件版本 1.0) 设计引物,即引物 *inos*,*cox-2*,*tnf- α* ,*il-1 β* ,*nf- κ b/p65*, β -*actin*. PCR 扩增反应条件及引物片段如下:

β -*actin*: F:5' - AGCCATGTACGTAGCCATCC - 3', R:5' - GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA - 3', 产物长度 222 bp; *tnf- α* : F:5' - CGTCAGC-CGATTTGCTATCT - 3', R:5' - CGGACTCCG-CAAAGTCT AAG - 3', 产物长度 205 bp. *il-1 β* : F:5' - GCCCATCCTCTGTGACTCAT - 3', R:5' - AGGCCACAGGTATTTTGTCTG - 3', 产物长度 229 bp. *nf- κ b/p65*: F:5' - GCGTACACATTCTGGG-GAGT - 3', R:5' - CCGAAGCAGGAGCTATCAAC

-3'产物长度178 bp,以上4对引物条件一致,均为:95℃预变性15 min,95℃变性15 s,60℃退火25 s,72℃延伸20 s,循环45次.*inos*:F:5'-CTG-CAGCACTTGGATCAGGAACCTG-3',R:5'-GG-GAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA-3',产物长度310 bp,其反应条件为:95℃预变性5 min,95℃变性45 s,60℃退火45 s,70℃延伸1 min,循环27次.*cox-2*:F:5'-TTGAAGACCAGGAGTACAGC-3',R:5'-GGTACAGTTCCATGACATCG-3',产物长度324 bp,反应条件:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,57℃退火45 s,72℃延伸30 s,循环36次^[15-16].PCR反应完成后,将反应产物使用含1 mg/mL溴化乙锭的1%琼脂糖胶,在水平电泳槽中,以电压90 V电泳45 min,电泳完成后,将含反应产物的琼脂糖胶置于Bio-Rad ChemiDoc XRS凝胶图像分析系统中进行图像采集和分析,并使用Quantity one 4.4.0软件计算各条带的荧光强度值及其与 β -actin的荧光强度比值.每组实验至少重复3次.

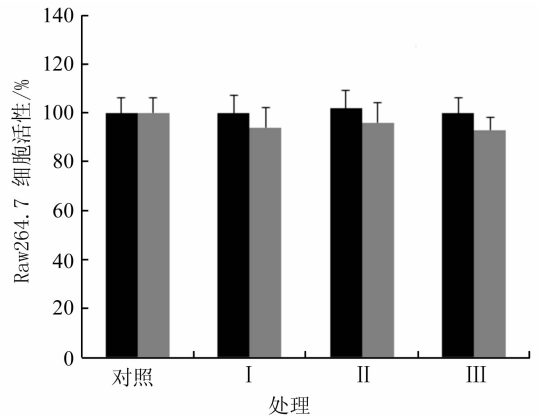
1.2.5 所有数据均使用SPSS 13.0统计软件包进行处理.各组数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析多组之间的比较, $p < 0.05$ 表示有统计学差异.

2 结果

2.1 17 β -E₂及Hcy对Raw 264.7细胞活性影响 单独Hcy(5 mmol/L)刺激1 h和预处理不同浓度的17 β -E₂(1,10 nmol/L和1 μ mol/L)1 h后加Hcy(5 mmol/L)刺激1 h与空白对照组相比对Raw 264.7细胞活性无明显影响(图1).

2.2 17 β -E₂在转录及翻译水平上抑制Hcy诱导的上调细胞炎性蛋白酶的表达 Raw 264.7细胞预处理1,10 nmol/L和1 μ mol/L的17 β -E₂1 h后,加入Hcy(5 mmol/L)刺激1 h.采用细胞免疫荧光双标记和RT-PCR方法检测发现,与其他组别相比,单纯Hcy处理组的细胞在COX-2蛋白和mRNA水平(图2A和3A)表现为明显上调.与之相反的是,使用不同浓度17 β -E₂预处理的Raw 264.7细胞,与单纯Hcy处理组相比,COX-2蛋白水平和mRNA水平(图2A和3A)明显降低,表现为剂量依赖.单纯Hcy处理组Raw 264.7细胞iNOS蛋白和mRNA(图2B和3B)表达水平上调明显.但是,与单纯Hcy处理组相比,预处理组的细

胞iNOS蛋白水平和mRNA水平(图2B和3B)表现为明显抑制,且预处理10 nmol/L 17 β -E₂后iNOS抑制最明显.



I:17 β -E₂1 nmol/L; II:17 β -E₂10 nmol/L;
III:17 β -E₂1 μ mol/L ■ -Hcy; ▨ +Hcy

图1 Raw 264.7细胞活性检测

Fig.1 Raw 264.7 Cell activity detection

2.3 17 β -E₂在转录及翻译水平上抑制Hcy诱导的细胞炎性因子的表达 Raw 264.7细胞预处理1,10 nmol/L和1 μ mol/L的17 β -E₂1 h后,加入Hcy(5 mmol/L)刺激1 h.应用细胞免疫荧光双标法检测细胞内炎性因子的蛋白表达.实验结果显示:在Hcy刺激后,Raw 264.7细胞内的TNF- α ,IL-1 β (图2C、图2D)的蛋白表达水平明显上调.预处理17 β -E₂(10 nmol/L)后明显抑制了Hcy诱导的Raw 264.7细胞炎性因子TNF- α 的释放,而17 β -E₂对IL-1 β 的抑制作用呈剂量关系.而RT-PCR检测结果显示:Hcy(5 nmol/L)刺激Raw 264.7细胞1 h之后,Raw 264.7细胞中*tnf*- α 和*il-1 β* mRNA水平较空白组相比有明显增加,而预处理浓度为20 μ mol/L的17 β -E₂抑制Hcy对*tnf*- α 的作用最为显著,且17 β -E₂抑制Hcy对*il-1 β* 的作用呈剂量依赖(图3C,3D).

2.4 17 β -E₂在转录及翻译水平上抑制Hcy诱导的上调细胞炎性信号蛋白NF- κ B/P65的表达 细胞免疫荧光双标和RT-PCR的检测结果表明:Hcy(5 mmol/L)刺激4 h后,细胞中的NF- κ B/P65蛋白和mRNA表达显著上调;不同浓度的17 β -E₂(1,10 nmol/L和1 μ mol/L)明显抑制了Hcy诱导的NF- κ B/P65蛋白和mRNA表达上调(图2E和3E),且当17 β -E₂浓度为10 nmol/L时抑制作用最明显.

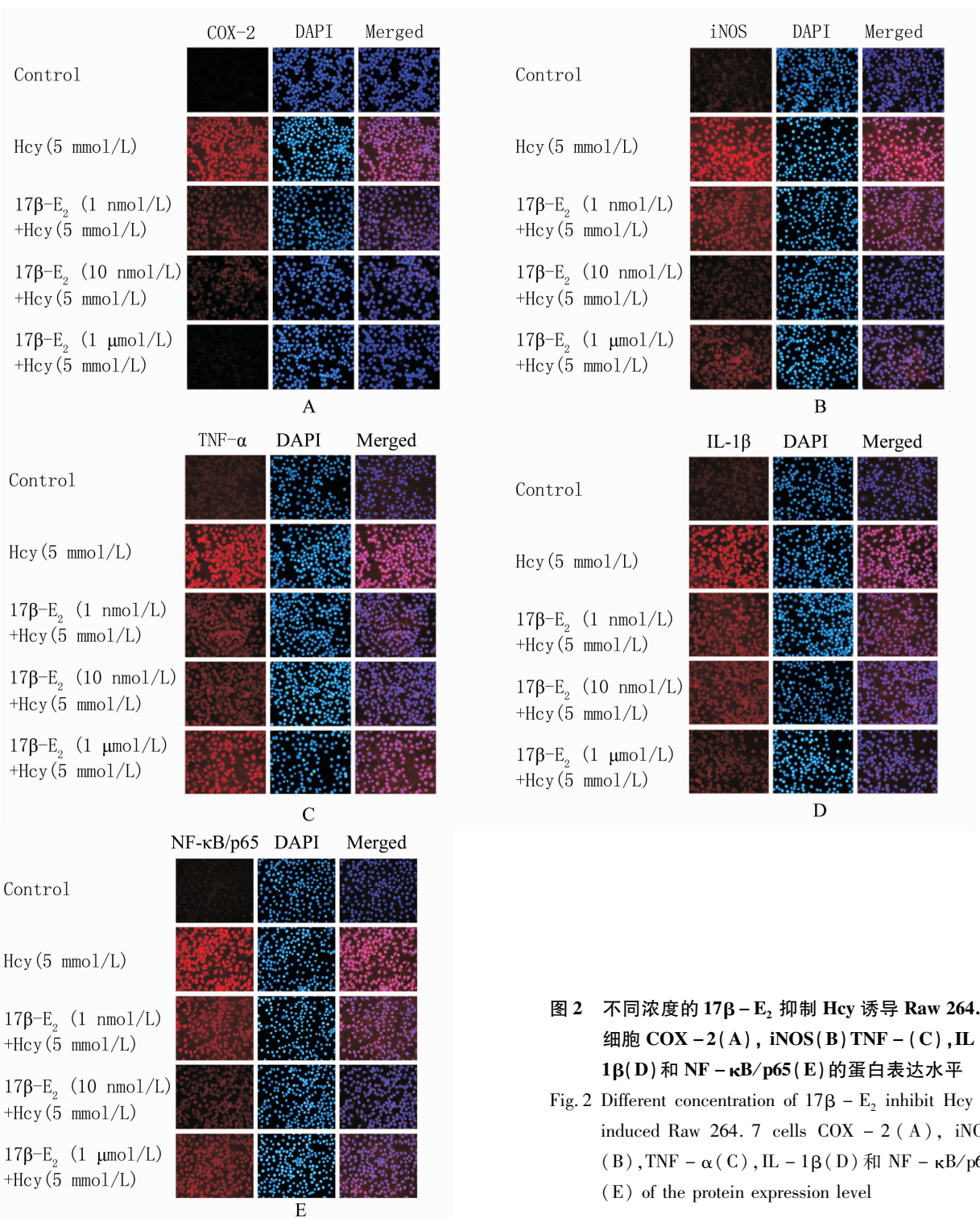


图2 不同浓度的17 β -E₂抑制Hcy诱导Raw 264.7细胞COX-2(A), iNOS(B), TNF- α (C), IL-1 β (D)和NF- κ B/p65(E)的蛋白表达水平

Fig. 2 Different concentration of 17 β -E₂ inhibit Hcy-induced Raw 264.7 cells COX-2 (A), iNOS (B), TNF- α (C), IL-1 β (D) and NF- κ B/p65 (E) of the protein expression level

3 讨论

骨的重塑过程是由成骨细胞和破骨细胞共同作用来完成的,这个过程包括成骨细胞的骨形成及破骨细胞的骨吸收.破骨细胞来源于骨髓单核巨噬

细胞系,由多核巨噬细胞组成,在人体生理性骨重建和病理性骨破坏过程中均发挥重要作用^[17].已有研究报道,Hcy能通过增加破骨细胞的数量和活性显著增加骨吸收^[18],此外,破骨细胞对氧化应激十分敏感,提高细胞中活性氧簇(ROS)的浓度可

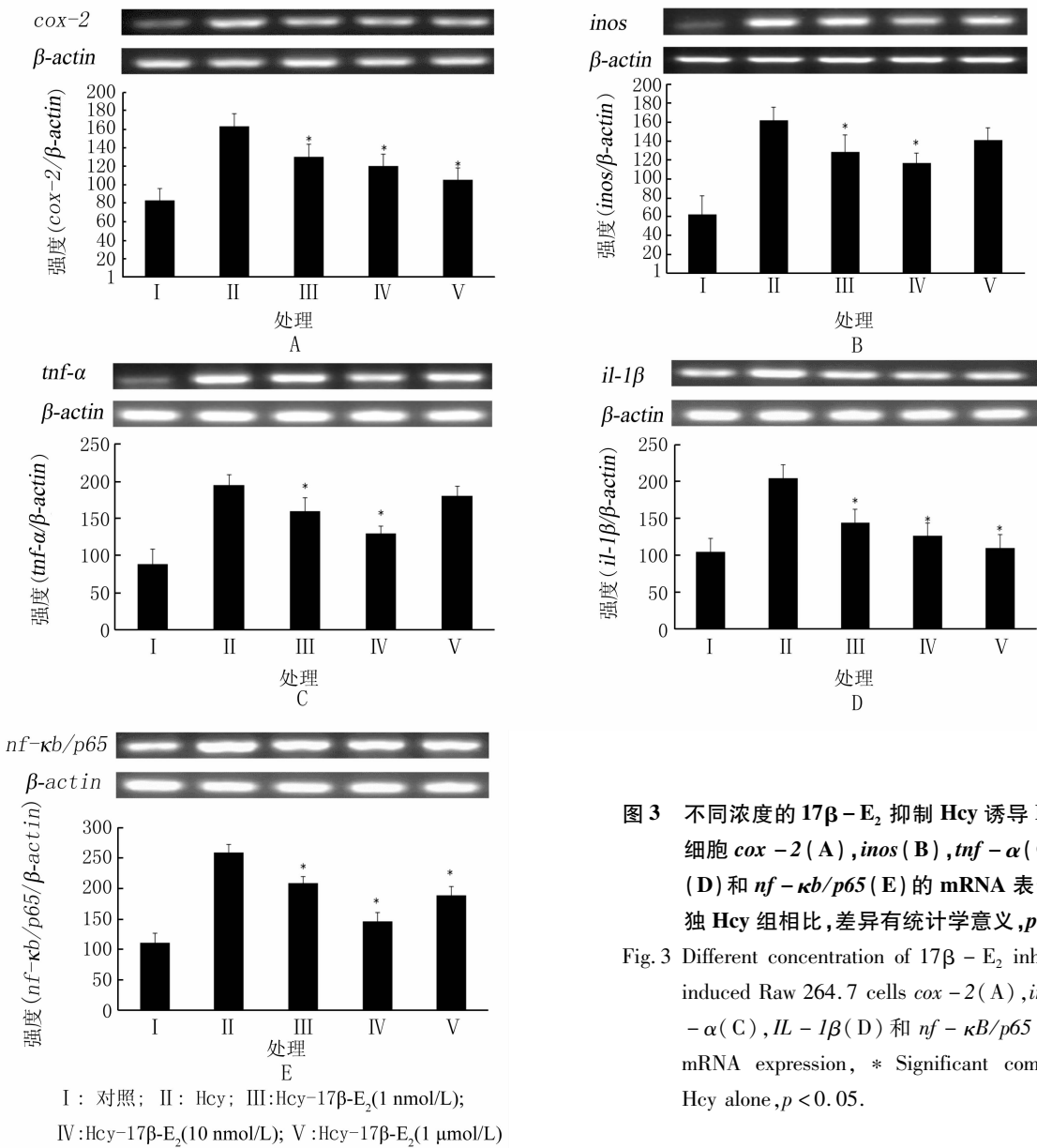


图 3 不同浓度的 17β -E₂ 抑制 Hcy 诱导 Raw 264.7 细胞 *cox-2* (A), *inos* (B), *tnf-α* (C), *il-1β* (D) 和 *nf-κB/p65* (E) 的 mRNA 表达, * 与单独 Hcy 组相比, 差异有统计学意义, $p < 0.05$.

Fig. 3 Different concentration of 17β -E₂ inhibit Hcy-induced Raw 264.7 cells *cox-2* (A), *inos* (B), *tnf-α* (C), *IL-1β* (D) 和 *nf-κB/p65* (E) of the mRNA expression, * Significant compared with Hcy alone, $p < 0.05$.

直接刺激破骨细胞生成,使破骨细胞中的炎性蛋白酶 COX-2, iNOS 和炎性细胞因子 TNF-α 和 IL-1β 活化. NO 是由 NOS 催化而产生的,已有文献报导,骨组织中存在内皮细胞 NOS (eNOS) 以及 inos. 在细胞因子、Hcy 和脂多糖诱导下,破骨细胞可诱导产生大量的 iNOS,从而发生 OP,前列腺素是花生四烯酸的代谢产物,具有很强的骨吸收刺激因子,其主要作用是通过破骨前体细胞的增殖和分化而实现^[19]. COX-2 为前列腺素合成的限速酶,可将花生四烯酸转化为前列腺素,因此以 iNOS 和 COX-2 为作用靶点的药物有可能对 OP 有利. TNF-α 和 IL-1β 是主要的炎性细胞因子,在骨质

疏松中通过破骨细胞产生,具有重要的作用^[20],因为其被认为是破骨细胞的重要因子. TNF-α 则可刺激破骨细胞的增生及活化^[21],在骨髓中通过自分泌和旁分泌作用,诱发骨源巨噬细胞产生 IL-1β. 因此,抑制破骨细胞的激活可防止 OP 的发生.

雌激素水平下降是引起绝经后骨质疏松症的主要原因之一,其可通过上调骨保护素(OPG)等的表达而影响成骨细胞的生成、增殖和分化,从而发挥促进成骨作用^[22],而雌激素抑制骨吸收,降低骨转化率的机制则是通过降低 IL-6 及 IL-11 的表达来防止绝经后骨质疏松的发生^[23-24]. 虽然 17β -E₂ 对骨质疏松的作用机制研究取得了的很

多方面的进展,但 17 β -E₂ 具体是通过哪些相关信号通路抑制 Hcy 诱导的破骨细胞的增生和活化尚未完全清楚.

本实验在研究 17 β -E₂ 对抗 Hcy 诱导的破骨细胞激活中是否通过炎性蛋白酶(iNOS 和 COX-2)表达和促炎性因子(TNF- α 和 IL-1 β)的分泌,通过构建 Hcy 诱导的破骨前体细胞株 Raw 264.7 细胞体外骨质疏松模型发现:不同浓度的 17 β -E₂ (1, 10 nmol/L 和 1 μ mol/L) 明显的抑制 Hcy 诱导的 Raw 264.7 细胞中 iNOS, COX-2, TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 和蛋白的表达,达到抑制破骨前体细胞株 Raw 264.7 细胞的激活的作用.

为阐明 17 β -E₂ 在 Raw 264.7 细胞中对炎性蛋白酶(iNOS, COX-2)和促炎细胞因子(TNF- α 和 IL-1 β)的表达的抑制机制,本实验主要研究了 17 β -E₂ 对炎性信号通路中的关键蛋白 NF- κ B 的作用. NF- κ B 是一种快反应转录因子,其广泛存在胞浆中,通常以 p65-p50 二聚体的形式存在,与抑制物 I κ B 结合而呈非活性状态.一般情况下, I κ B 在炎性信号刺激下,能被 I κ B 酶 IKK 磷酸化及被蛋白酶降解^[14]. 但实际上,雌激素通过抑制由 Hcy 或 TNF- α 诱导的 NF- κ B 的核转位发挥作用,但不改变 IKK 活性. NF- κ B 被抑制后,减弱调节基因表达(如 *inos*, *cox-2*, *tnf- α* 和 *il-1 β*)使其表达减弱^[25],从而抑制 Raw 264.7 细胞的激活. 我们的研究证实:在 Raw 264.7 细胞中,不同浓度的 17 β -E₂ (1 nmol/L, 10 nmol/L 和 1 μ mol/L) 在翻译和转录水平上明显抑制了 Hcy 诱导的 NF- κ B/P65 的表达.

通过上述综合评价分析,17 β -E₂ 的作用机制可能是通过抑制 Hcy 诱导的 Raw 264.7 细胞炎性信号通路中关键蛋白 NF- κ B 的表达,进而抑制炎性蛋白酶(iNOS 和 COX-2)表达和促炎细胞因子(TNF- α 和 IL-1 β)释放从而达到抑制破骨细胞激活、抗骨质疏松的作用.

参考文献:

[1] RAY N F, CHAN J K, THAMER M, et al. Medical expenditures for the treatment of osteoporotic fractures in the United States in 1995: report from the National Osteoporosis Foundation[J]. J Bone Miner Res, 1997, 12 (1): 24-35.

[2] MELTON LJ III. Adverse outcomes of osteoporotic frac-

tures in the general population[J]. J Bone Miner Res 2003, 18(6): 1 139-1 141.

[3] CENTER J R, NGUYEN T V, SCHNEIDER D, et al. Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study[J]. Lancet 1999, 353(9156): 878-882.

[4] 刘忠厚, 骨质疏松学[M]. 北京: 科学技术出版社, 2000.

[5] VAN MEURS J B, DHONUKSHE - RUTTEND R A, PLUIJM S M, et al. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture[J]. N Engl J Med, 2004, 350 (20): 2 033-2 041.

[6] MCLEAN R R, JACQUES P F, SELHUB J, et al. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons[J]. N Engl J Med, 2004, 350(20): 2 042-2 049.

[7] MIKAEL L G, ROZEN R. Homocysteine modulates the effect of simvastatin on expression of ApoA-1 and NF- κ B/iNOS[J]. Cardiovasc Res, 2008, 80 (1): 151-158.

[8] 朴春花, 同型半胱氨酸测定的临床意义[J]. 医学理论与实践, 2009, 22(11): 1 307-1 308.

[9] BAX B E, ALAM ASMT, BASHAB B, et al. Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 183 (3): 1 153-1 158.

[10] YAN D J, CHEN Z W. 17 β -Estradiol increased the expression of daintain/AIF-1 in Raw 264.7 macrophages[J]. Biosci Biotechnol Biochem. 2010, 74(10): 2 103-2 105.

[11] GARCÍA PALACIOS V, ROBINSON L J, BORYSENKO C W, et al. Negative regulation of RANKL-induced osteoclastic differentiation in Raw 264.7 Cells by estrogen and phytoestrogens[J]. J Biol Chem. 2005, 280(14): 13 720-13 727.

[12] MANSON J E, HSIA J, JOHNSON K C, et al. Women's healthy initiative investigators, estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease[J]. N Engl J Med, 2003, 349(6): 523-534.

[13] JENNY M, LEAN, CHRI J. JAGGER, et al. Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation[J]. Endocrinology, 2005, 146 (2): 728-735.

[14] 严明敏, 毛善平, 刘宝辉, 等. 五味子乙素对 A β ₍₂₅₋₃₅₎ 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 卒中与神经疾病, 2010, 4(17): 212-216.

[15] 钟莲梅, 宗一, 戴纪男, 等. 元宝枫叶黄酮抑制脂多糖诱导的小胶质细胞激活的作用[J]. 云南大学学

- 报:自然科学版,2011,33(3):345-349.
- [16] DAI J N, ZONG Y, ZHONG L M, et al. Gastrodin inhibits expression of inducible NO synthase, cyclooxygenase - 2 and proinflammatory cytokines in cultured LPS - stimulated microglia via MAPK pathways [J]. *PLoS ONE* 2011, 6(7):21 891.
- [17] ISHII M, SAEKI Y. Osteoclast cell fusion: mechanisms and molecules [J]. *Mod Rheumatol*, 2008, 18(3):220-227.
- [18] HERRMANN M, WILDERMANN B, CLAES L, et al. Experimental hyperhomocysteinemia reduces bone quality in rats [J]. *Clinical Chemistry*, 2007, 53(8):1 455-1 461.
- [19] RAISZ L G. RAI Physiologic and pathologic roles of prostaglandins and other eicosanoids in bone metabolism [J]. *J Nutr*, 1995, 125:2 024S-2 027S.
- [20] KOH J M, LEE Y S, KIM D J, et al. Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation [J]. *Clinical Chemistry*, 2007, 53(8):1 455-1 461.
- [21] ROGGIA C, GAO Y, CENCI S, et al. Up - regulation of TNF - producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(24):13 960-13 965.
- [22] 苏欣, 廖二元, 朱旭萍, 等. 雌二醇对人成骨细胞护骨素、护骨素配体及其相关因子的调节 [J]. *中华老年医学杂志*, 2004, 23(3):153-156.
- [23] Spenser S Smith, Jackiline Rodriguez, Reyes Kate S Arbon, et al. Cadmium - induced decrease in RUNX2 mRNA expression and recovery by the antioxidant N - acetylcysteine (NAC) in the human osteoblast - like cell line, Saos - 2 [J]. *Toxicology in Vitro*, 2009, 23(1):60-66.
- [24] Jin - Ran Chen, Kartik Shankar, Shanmugam Nagrajan, et al. Protective effects of estradiol on ethanol - induced bone loss involve inhibition of reactive oxygen species generation in osteoblasts and downstream activation of the extracellular signal - regulated kinase/signal transducer and activator of transcription 3/receptor activator of nuclear factor - κ B ligand signaling cascade [J]. *JPET*, 2008, 324(1):50-59.
- [25] Serena Ghisetti, Clara, Adriana Maggl, et al. 17 β - Estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF - κ B intracellular localization [J]. *Molecular and cellular biology*, 2005, 25(8):2 957-2 968.

The effects of 17 β - estradiol attenuated homocystine - induced activation of Raw 264.7 cells

HE Ying¹, CHENG Xue-qiu², ZONG Yi¹, ZHAN Dong¹, YANG Ping¹, LIU Shi-chang¹, LU Di¹, GUI Li³

(1. Department of Anatomy, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

2. Department of Anatomy, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

Department of Endocrinology, The Third Hospital of Yunnan Province, Kunming 650000, China)

Abstract: To investigate suppressing effects of 17 β - Estradiol (17 β - E₂) in the activation of Raw 264.7 cells, the cells were treated with 17 β - E₂ prior to Homocystine (Hcy) exposure, then the effects on the mRNA and protein levels of pro - inflammatory enzymes, cyclooxygenase - 2 (COX - 2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS), and pro - inflammatory cytokines, tumor necrosis factor - α (TNF - α), and interleukin - 1 β (IL - 1 β), inflammatory signaling proteins nuclear factor - κ B (NF - κ B) were analysed by reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR) and double - immunofluorescence labeling assay, and the effects of 17 β - E₂ on viability of Raw 264.7 cells were measured by MTT assay. The results showed that 17 β - E₂ had an effect on COX - 2, iNOS, TNF - α , IL - 1 β , NF - κ B protein and mRNA expression levels. Arising from the above, we think 17 β - E₂ can restrain osteoclasts activity by means of regulation Hcy - induced pro - inflammatory mediators in Raw 264.7 cells, and exert its anti - osteoporosis actions.

Key words: 17 β - Estradiol (17 β - E₂); homocystin (Hcy); pro - inflammatory cytokines; Raw 264.7 cells; reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR)