

大鼠创伤性股骨头坏死进程中 ATF4 与 GPR48 的表达联控

宋会平¹, 王志强¹, 毕若杰¹, 李琪佳²

(河北联合大学 1. 附属医院骨科; 2. 实验中心, 河北唐山 063000)

摘要:目的 探讨大鼠创伤性股骨头坏死进程中活性转录因子 4(ATF4)与 G 蛋白偶联受体 48(GPR48)的表达方式及其相关性,研究两者在坏死进程中的联控效应。方法 6 月龄 SD 大鼠 36 只,随机分为实验组($n=24$)和对照组($n=12$)。实验组采用圆韧带离断结合骨膜翻转术,对照组采用假手术作为对照。术后 1、2、4 周收集双侧股骨头,采用组织学、免疫组织化学、RT-PCR、Western blotting 等方法检测股骨头坏死变化、ATF4 动态表达变化及其与 GPR48 表达的相关性。结果 ①组织学观察显示,股骨头坏死为渐进性发展,实验组 1、2 周股骨头关节软骨表面略显粗糙,4 周时关节软骨出现不同程度的虫蚀样破损;②免疫组化显示,实验组 ATF4、GPR48 和 PCNA 表达量在 3 个不同时间点逐渐增加,但均低于对照组($P<0.05$);③ RT-PCR 结果显示,ATF4 和 GPR48 在 3 个不同时间点逐渐增加($P<0.05$)。④ Western blotting 分析显示,实验组 ATF4 和 GPR48 在 3 个不同时间点逐渐增加,但均低于对照组($P<0.05$)。⑤ Pearson 相关性分析显示,ATF4 与 GPR48 在不同时间点呈正相关($r=0.659, P<0.01$)。结论 创伤性股骨头坏死发展进程中,初期 ATF4 和 GPR48 表达下降,但随坏死进程而逐渐增加,两者表达呈正相关,可能与坏死所伴随的局部修复有关。

关键词:活性转录因子 4; G 蛋白偶联受体 48; 股骨头缺血坏死; 创伤; 大鼠

中图分类号:R641 文献标志码:A

Correlation of ATF4 and GPR48 expressions in the progression of traumatic necrosis of the femoral head in rats

SONG Hui-ping¹, WANG Zhi-qiang¹, BI Ruo-jie¹, LI Qi-jia²

(1. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital;

2. Experimental Center, Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei, China)

Abstract: Objective To explore the correlation between ATF4 and GPR48 expressions, which might reflect the correlative regulation effects during the progression of traumatic necrosis of the femoral head in rats. **Methods** A total of 36 SD rats were divided into two groups: the experimental group ($n=24$) which were models of traumatic necrosis of the femoral heads operated with Norman's technique, and the control group ($n=12$) which received sham operation. The femoral heads were collected 1w, 2w and 4w after operation, and then analyzed with histological and immunohistochemical methods, RT-PCR and Western blotting to observe the progression of necrosis. **Results** From the 1st to 4th week, the necrosis gradually aggravated. In the 4th week, there were breakages on the articular cartilage with rough surface. Immunohistochemical analysis showed that the expressions of ATF4, GPR48 and PCNA in the experimental group gradually increased, but were significantly lower than those in the sham operation group ($P<0.05$) at the same time point. RT-PCR results suggested that mRNA of ATF4 and GPR48 gradually increased with time going. Western blotting displayed that the protein expressions of ATF4 and GPR48 gradually elevated in the experimental group, and ATF4 had a positive correlation with GPR48 ($r=0.659, P<0.01$). **Conclusion** In the progression of traumatic necrosis of

the femoral head, the expressions of ATF4 and GPR48 decline in the initial stage but may gradually increase. There is a positive correlation between them, which might be associated with the concomitant repair of the necrotic bone.

Key words: Activating transcriptional factor 4; G-protein coupled receptor 48; Osteonecrosis of the femoral head; Trauma; Rats

股骨头缺血坏死(Osteonecrosis of the femoral head, ONFH)是临床多发病、常见病,致残率高、治疗困难,但其发病机制尚不明确^[1],可能与 Cbf 1/Runx 2、aP2 等多种因子作用相关^[2-4]。活性转录因子 4(activating transcriptional factor 4, ATF4)是新发现的调控成骨细胞分化和功能的转录激活因子,是 ATF/CREB 转录因子超家族的成员之一,参与多种生理过程的调控^[5-6]。近年研究表明,ATF4 是 G 蛋白偶联受体 48(G-protein coupled receptor 48, GPR48)的下游因子之一,是调节骨骼发育的重要因子^[7-8],但两者在股骨头坏死进程中的表达变化和相关性尚不明确。本实验通过建立创伤性股骨头坏死模型,探讨坏死局部 ATF4 和 GPR48 表达变化及其相关性,有助于进一步了解创伤性股骨头坏死的分子调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 6 月龄 SD 大鼠 36 只,体质量 550~600 g,雌雄不限,由华北煤炭医学院实验动物中心提供。动物随机分为实验组($n=24$)和对照组($n=12$);造模后按 1、2、4 周将 SD 大鼠随机分成 3 组,每个时间点实验组 8 只,对照组 4 只。

1.1.2 主要试剂与仪器 ATF4、GPR48 及 PCNA 兔抗鼠多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司),Trizol(天津翔天科技有限公司),DEPC(美国 Amresco 公司),M-MLV 逆转录试剂盒及 PCR 引物(上海生物工程技术有限公司);辣根过氧化物酶 HRP 标记的羊抗兔 IgG 及化学发光试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),Western Blotting Luminol Reagent(美国 Santa Cruz 公司),低温平衡离心沉淀机(北京医学离心机厂),图像分析系统(Image-Pro Plus 6.0),石蜡切片机(德国 Leica 公司),超净台(美国 Forma scientific company)。

1.2 方法

1.2.1 创伤性股骨头坏死模型的建立 按照 Norman 等^[9]方法建模。大鼠麻醉后,取俯卧位,经大转子沿大腿方向切开皮肤皮下组织,劈开臀大肌,分离前 2/3 臀中肌,沿着转子的边缘横断髋关节囊的前

外侧,切断圆韧带,将股骨头脱位,用尖刀剥离股骨颈基底骨膜和纤维翻转切除,复位股骨头,生理盐水冲洗切口,逐层缝合。对照组行假手术,仅暴露股骨头,不破坏股骨头血运。术后 3 d 内给予青霉素(5 万 U/d)肌肉注射预防感染。

1.2.2 大体观察及组织学分析 术后 1、2、4 周截取双侧股骨头,大体观察股骨头形状、颜色和关节软骨表面情况。股骨头经 40 g/L 多聚甲醛固定后 EDTA 脱钙,常规脱水、透明,石蜡包埋,制作 4 μm 厚度切片,常规 HE 染色,光镜下观察组织形态学变化。

1.2.3 免疫组织化学检测 ATF4、GPR48 和 PCNA 的表达 上述切片脱蜡至水,用 3% H_2O_2 甲醇溶液室温孵育 15 min, PBS 洗 3 次, 3 min/次;胰酶消化, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 3 min/次;分别滴加经 1:300 稀释的兔抗鼠 ATF4、GPR48 和 PCNA 兔抗鼠多克隆抗体, 4 $^\circ\text{C}$ 过夜; PBS 洗片后滴加二抗工作液, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 50 min, PBS 洗 3 次, 3 min/次; DAB 显色,显微镜下有棕黄色物质出现时终止显色;蒸馏水冲洗,苏木素复染细胞核,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

实验组 3 个时间点分别取 5 个标本,每个标本做 3 个切片,每个切片在同一放大倍数下进行分析,按等距抽样原则随机选择 5 个视野,阳性细胞的胞膜、胞浆、胞核中有棕黄显色。用图像分析软件分析染色强度,结果用 IOD 值表示。

1.2.4 RT-PCR 法检测 ATF4 和 GPR48 mRNA 表达 按照 Trizol RNA 标准分离方法抽提股骨头组织总 RNA,在 M-MuLV 逆转录酶作用下将 RNA 逆转录成 cDNA,采用 PCR 扩增技术,以 R-actb 为内参,检测组织中 ATF4 和 GPR48 mRNA 表达。引物序列见表 1。反应结束后,对照组 0 $\mu\text{mol/L}$ ATF4 和 GPR48 的 mRNA 表达为 1,结果用 Rotor-Gene 6.0.14 软件进行分析。

表 1 RT-PCR 引物序列及目的基因

基因名称	引物	引物序列	产物长度(bp)
GPR48	Primer F	5'-GGTCTCTGGCAGTCTTCTCCTC-3'	104
	Primer R	5'-GCTCTCCCGTGTTCATCAAATC-3'	
R-actb	Primer F	5'-TGCTGAGTATGTCGTGGAG-3'	150
	Primer R	5'-GTCTTCTGAGTGGCAGTGAT-3'	

1.2.5 Western blotting 检测 ATF4 和 GPR48 的蛋白表达 将液氮冻存的股骨头研磨成粉末(实验组和对照组各时间点各获 8 侧和 6 侧),经组织裂解液匀浆后,提取总蛋白。取 50 μg 蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳,用电转移法将蛋白转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入 ATF4、GPR48 一抗(1:300)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,TBST 漂洗 45 min,HRP 标记的二抗(1:1500)室温孵育 1 h,TBST 漂洗 45 min。暗室中按照化学发光试剂盒进行发光显影、扫描图像,用图像分析仪对显影带进行分析处理, β -actin 作为内参,结果用 IOD 值表示。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析和 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

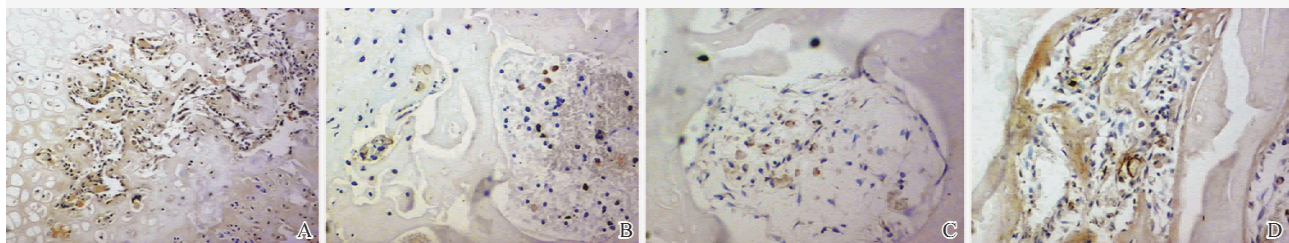


图 1 不同时间点 ATF4 免疫组化染色结果 ($\times 100$)
A: 对照组 4 周; B: 实验组 1 周; C: 实验组 2 周; D: 实验组 4 周。

Fig. 1 Immunohistochemical analysis of ATF4 at different time points ($\times 100$)

A: Control group 4 week; B: Experimental group 1 week; C: Experimental group 2 week; D: Experimental group 4 week.

经图像定量分析显示,1、2 和 4 周时,对照组 ATF4 表达量(IOD 值)分别为 18.99 ± 2.78 、 18.44 ± 3.51 、 18.91 ± 3.32 ;实验组分别为 8.13 ± 1.68 、 11.81 ± 3.03 、 13.50 ± 3.04 。经方差分析,实验组 1、2、4 周 ATF4 表达低于对照组,但实验组 ATF4 随着时间延长表达量逐渐增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 免疫组化检测 GPR48 的表达结果 GPR48 呈现黄色或棕黄色,破骨细胞、成骨细胞、骨细胞、血管内皮、脂肪细胞等均可见阳性表达。实验组阳性细胞表达强度较假手术组降低。经图像定量分析显示,1、2 和 4 周时,对照组 GPR48 蛋白表达量分别为 20.50 ± 2.71 、 20.88 ± 2.84 和 20.73 ± 3.17 ;实验组分别为 9.06 ± 1.93 、 13.58 ± 2.83 和 17.00 ± 2.20 。经方差分析显示,实验组各时间点 GPR48 表达低于对照组,随时间延长实验组 3 个时间点间表达量逐渐增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 免疫组化检测 PCNA 的表达结果 1、2 和 4 周时,对照组 PCNA 表达量分别为 17.13 ± 2.62 、 17.45 ± 2.51 、 17.44 ± 2.96 ;实验组分别为 9.21 ± 2.69 、 12.56 ± 1.74 、 14.72 ± 2.27 。经方差分析,实验组 PCNA 表达低于对照组,随时间延长实验组 3

2 结果

2.1 大体观察及组织学分析 1、2 周股骨头颜色黄白、关节软骨表面无光泽;4 周关节软骨出现不同程度破损、断裂、虫蚀样痕迹,表面不光滑。1、2 周部分关节软骨表面出现破裂、剥脱,基底层软骨细胞增生,小梁之间造血组织减少。4 周软骨下坏死区骨质破坏严重,骨小梁稀疏、变窄、断裂,坏死小梁骨细胞数量明显减少,多见空骨陷窝;但同时可见成骨细胞活跃迹象,部分坏死小梁周围成骨细胞增多,有新生骨形成。

2.2 免疫组化检测 ATF4 的表达结果 光镜下,ATF4 呈现黄色或棕黄色,破骨细胞、成骨细胞、骨细胞、血管内皮、脂肪细胞等均可见阳性表达。实验组阳性细胞表达强度较假手术组降低,见图 1。

个时间点间表达量逐渐增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 ATF4 和 GPR48 mRNA 的表达 实验组 ATF4 和 GPR48 mRNA 的相对表达随着时间的延长而逐渐升高,实验组 3 个时间点相比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 实验组 ATF4 和 GPR48 mRNA 的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

时间	ATF4	GPR48
1 周	7.770 ± 0.190	5.553 ± 0.232
2 周	9.660 ± 0.186	4.618 ± 0.186
4 周	11.567 ± 0.227	3.688 ± 0.149

2.6 ATF4 和 GPR48 的蛋白表达 见图 2。由图 2 可见,实验组随着时间延长,ATF4 和 GPR48 蛋白表达量逐渐升高。实验组各时间点经 Pearson 相关性分析,GPR48 与 ATF4 蛋白表达量呈正相关($r = 0.659$, $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 实验组 ATF4 和 GPR48 蛋白的相对表达量($\bar{x} \pm s$)

时间	ATF4	GPR48
1 周	8.48 ± 4.00	17.09 ± 2.55
2 周	10.12 ± 5.45	20.21 ± 3.79
4 周	28.34 ± 17.15	56.62 ± 19.30

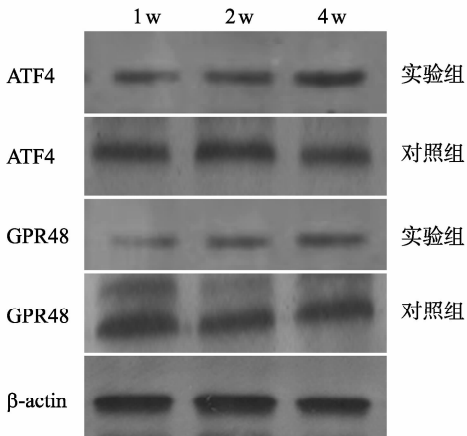


图2 不同时间点 Western blotting 检测结果
Fig.2 Western blotting analysis of ATF4 and GPR48 at different time points(×100)

3 讨论

正常股骨头表面覆盖关节软骨,软骨层主要由软骨细胞和基质组成,基质的主要成分是胶原纤维和糖蛋白。骨小梁支撑着关节软骨,一旦骨细胞坏死小梁将失去矿化调节渐变的脆弱,负荷能力下降而发生断裂^[10],从而导致股骨头变形,关节软骨塌陷。生理条件下骨细胞会正常凋亡,存在一定量的空骨陷窝,但大量空骨陷窝的出现提示,骨细胞生长环境恶劣导致大量成骨细胞死亡,是股骨头缺血坏死的前兆,但随着股骨头坏死进程发展,往往也伴随某些局部修复^[11]。

本实验采用创伤性方法制作股骨头缺血坏死模型,按照 Norman 等^[9]方法,切断股骨头圆韧带,将股颈周围骨膜剥离翻转切除,切断股颈周围关节囊的纤维附着点,破坏股骨头血运,最终使股骨头缺血坏死。本实验结果显示,实验组髓腔内间充质细胞数量逐渐增多、分化,股骨头内骨吸收改建作用逐渐增强。但股骨头坏死的同时伴随着局部修复过程,组织形态学表现为局部成骨细胞活跃,局部成骨细胞 PCNA 所反映的增殖活性渐趋增强。同时,实验组 3 个时间点空骨陷窝数量随时间呈上升趋势,也符合股骨头的缺血坏死的发展进程。

迄今为止,关于股骨头缺血坏死的分子机制尚不明确。ATF4 是新发现的调控成骨细胞分化和功能的转录激活因子,是 ATF/CREB 转录因子超家族的成员之一,参与多个重要生理过程的调控^[5],包括内质网应急反应、骨的再吸收、骨髓造血和晶体发育等^[6,12-14]。利用基因敲除技术研究发现,ATF4 缺陷的小鼠终生表现严重的骨质疏松^[13],说明 ATF4 在成骨细胞的分化和骨质的形成中发挥着重要作

用;其对骨组织调控主要通过两种机制:易化相关基因的表达和增加成骨细胞中氨基酸的摄取^[14]。近年研究表明,ATF4 是上游膜信号控制分子 GPR48 的一个重要靶向因子,可刺激 c-Myc 和 cyclin D1 发挥细胞增殖行为,通过信号转导共同调节骨发育^[15-17]。

GPR48 是一重要细胞膜分子信号,为糖蛋白激素受体亚家族,其功能是将外界刺激通过一系列信号转导途径传入细胞核,引发多种转录因子产生相应生物学效应,调控细胞增殖、分化、凋亡等生物学行为,是关键性的信号传导闸门^[16]。Kitagawa 等^[18]研究发现,GPR48 经 G 蛋白的 Gas 亚基与 cAMP-PKA 的信号通路相偶联,调节细胞内分子信号途径,ATF4/CREB 是 cAMP-PKA 主要的下游转录因子,GPR48-cAMP-PKA-ATF4/CREB 构成一个完整的信号转导通路,协同调控细胞的增殖、分化,并调节胚胎骨发育^[18]。因此,研究 ATF4 和 GPR48 在创伤性股骨头坏死的发展过程中的信号联控,有利于进一步理解其发病机制。

组织学研究表明,创伤致股骨头坏死初期往往表现为局部急性坏死,随着坏死灶的发展,局部同时出现骨重建和骨再生伴生现象。本实验结果表明,ATF4 与 GPR48 在股骨头坏死进程中的表达量是随着时间逐渐上升的,两者呈正相关性与 PCNA 所反映的细胞增殖效应相一致;结合形态学发现,表明这种升高趋势可能与同时伴随的局部修复过程有关。

综上所述,ATF4 和 GPR48 在股骨头坏死发展进程中的表达降低但呈现逐渐升高的趋势,可能与局部修复增加有关。但有关 ATF4 与 GPR48 在股骨头坏死发生发展进程中的具体作用机制和途径尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 康鹏德,裴福兴,沈彬. 股骨头坏死动物模型研究现状[J]. 中华骨科杂志, 2010, 30(1):29-32.
- [2] 童培建,毛强,吴承亮,等. 大鼠激素性股骨头坏死组织氧化应激相关基因的差异表达[J]. 中华骨科杂志, 2011,31(7):794-799.
- [3] Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblast[J]. Cell, 1997, 89(5):755-764.
- [4] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation[J]. Cell, 1997, 89(5):747-754.
- [5] Ameri K, Harris A L. Activating transcription factor 4

- [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(1):14-21.
- [6] Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, et al. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappa as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway[J]. *Nature*, 1999, 398(6724):252-256.
- [7] Yang X, Karsenty G. ATF4, the osteoblast accumulation of which is determined post-translationally, can induce osteoblast-specific gene expression in non-osteoblastic cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(45):47109-47114.
- [8] Dobрева G, Chahrouh M, Dautzenberg M, et al. SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation[J]. *Cell*, 2006, 125(5):971-986.
- [9] Norman D, Reis D, Zinman C, et al. Vascular deprivation-induced necrosis of the femoral head of the rat. An experimental model of avascular osteonecrosis in the skeletally immature individual or Legg-Perthes disease[J]. *Int J Exp Pathol*, 1998, 79(3):173-181.
- [10] Boss J H, Misselevich I. Osteonecrosis of the femoral head of laboratory animals: the lessons learned from a comparative study of osteonecrosis in man and experimental animals[J]. *Vet Pathol*, 2003, 40(4):345-354.
- [11] Blair J M, Zheng Y, Dunstan C R, et al. RANK ligand [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(6):1077-1081.
- [12] Weng J, Luo J, Cheng X, et al. Deletion of G protein-coupled receptor 48 leads to ocular anterior segment dysgenesis (ASD) through down-regulation of Pitx2 [J]. *PNAS*, 2008, 105(16):6081-6086.
- [13] Masuoka H C, Townes T M. Targeted disruption of the activating transcription factor 4 gene results in severe fetal anemia in mice[J]. *Blood*, 2002, 99(3):736-745.
- [14] Yang X, Matsuda K, Bialek P, et al. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome [J]. *Cell*, 2004, 117(3):387-398.
- [15] Li X Y, Lu Y, Sun H Y, et al. G protein-coupled receptor 48 upregulates estrogen receptor alpha expression via cAMP/PKA signaling in the male reproductive tract [J]. *Development*, 2010, 137(1):151-157.
- [16] Luo J, Zhou W, Zhou X, et al. Regulation of bone formation and remodeling by G-protein-coupled receptor 48 [J]. *Development*, 2009, 136(16):2747-2756.
- [17] Song H, Luo J, Luo W, et al. Inactivation of G-protein-coupled Receptor 48 (ATF4/Lgr4) impairs definitive erythropoiesis at midgestation through down-regulation of the ATF4 signaling pathway[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(52):36687-36697.
- [18] Gao Y, Kitagawa K, Hiramatsu Y, et al. Up-regulation of GPR48 induced by down-regulation of p27Kip1 enhances carcinoma cell invasiveness and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(24):11623-11631.

(编辑:徐苗蓁)

读者·作者·编者

缩略语使用

凡已被公知公认的缩略语可以不加注释直接使用。例如:DNA、RNA、HbsAg、PCR等。不常用的、尚未被公知公认的缩略语,以及原词过长在文中多次出现者,若为中文可于文中第一次出现时写出全称,在圆括号内写出缩略语;若为外文可于文中第一次出现时写出中文全称,在圆括号内写出外文全称及其缩略语。例如:流行性脑脊髓膜炎(流脑),阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(obstructive sleep apnea syndrome, OSAS)。不超过4个汉字的名词不宜使用缩略语,以免影响可读性。西文缩略语不得拆开转行。

(本刊编辑部)