

HIF-1 信号通路与绝经后骨质疏松的关系研究^{*}

钟 航¹, 曹 参², 杨 静¹, 黄 强^{1△}

1. 四川大学华西医院 骨科 (成都 610041); 2. 河北省人民医院 骨科 (石家庄 050051)

【摘要】 目的 初步探索低氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路在绝经后骨质疏松(PMOP)发病过程中的作用及其作用机制。方法 C57BL/6J 雌性小鼠随机分为假手术组(A组)、去卵巢绝经后骨质疏松组(B组)、溶剂对照组(C组)和 HIF-1 α 抑制剂 2-甲氧雌二醇(2ME2)治疗组(D组),每组 15 只。造模后 3 月处死小鼠,采用 ELISA 检测血清雌激素、小鼠 I 型胶原氨基末端肽(PINP)及小鼠 I 型胶原羧基末端肽(CTX-1)等骨代谢指标,HE 染色和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色观察骨结构及破骨细胞变化,免疫组化检测 HIF-1 α 、HIF-1 β 、脯氨酰羟化酶结构域蛋白(PHD)、Hippel-Lindau 肿瘤抑制蛋白(VHL)及低氧诱导因子抑制因子(FIH)等 HIF-1 信号通路的调节产物。取 A、B 组小鼠骨髓诱导培养破骨细胞,Western blot 检测抑制蛋白激酶 B (Akt)、细胞外调节蛋白激酶(ERK)、核因子- κ B (NF- κ B)信号通路后破骨细胞内 HIF-1 α 变化。结果 B 组小鼠骨代谢指标较 A 组升高($P<0.001$),破骨细胞 HIF-1 α 蛋白阳性表达,骨髓区 HIF-1 α 蛋白表达量较 A 组升高($P<0.001$),HIF-1 β 、PHD、VHL、FIH 水平无明显变化。HIF-1 α 抑制剂抑制 HIF-1 后,去卵巢骨质疏松小鼠骨代谢指标降低($P<0.001$),骨质疏松程度明显改善。予以 Akt、ERK、NF- κ B 信号通路抑制剂干预后,去卵巢骨质疏松小鼠破骨细胞内 HIF-1 α 水平均下降($P<0.05$)。结论 HIF-1 信号通路参与了小鼠 PMOP 的病理演变过程,抑制 HIF-1 信号通路可改善 PMOP 的严重程度;PMOP 破骨细胞内 HIF-1 信号通路的上调可能与 Akt、ERK、NF- κ B 这 3 条信号通路有关。

【关键词】 去卵巢 骨质疏松 HIF-1 α 破骨细胞

Research on Relationship of HIF-1 Signaling Pathway and Postmenstrual Osteoporosis ZHONG Hang¹, CAO Can², YANG Jing¹, HUANG Qiang^{1△}. 1. Department of Orthopedic Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Orthopedic Surgery, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China

△ Corresponding author, E-mail: huangqiang4325@126.com

【Abstract】 Objective Exploring the role of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway in postmenstrual osteoporosis (PMOP) and how to play a role in PMOP. **Methods** Sixty C57BL/6J female mouse were randomly divided into 4 groups: sham-operation group (A group), ovariectomized PMOP group (B group), HIF-1 alpha inhibitor 2-methoxy estradiol (2ME2) treatment group(D group) and solvent control group(C group), 15 mice in each group. Three months after modeling, the metabolism product of mouse bone tissue including serum propeptide of type I procollagen (PINP), C-terminal telopeptide- I (CTX-1) and serum estrogen were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Changes of bone structure were observed on HE stained tissue sections. Regulation products of HIF-1 signaling pathway including HIF-1 α , HIF-1 β , specific prolyl hydroxylases (PHD), Hippel-Lindau tumor suppressor protein (VHL), and factor inhibiting HIF (FIH) were measured by immuno-histochemistry staining. Osteoclasts derived from OVX-mice were treated with inhibitors of extracellular regulated protein kinases (ERK), protein kinase B (Akt) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathways. HIF-1 α expression were detected by Western blot to obtain a rudimentary knowledge of possible mechanism of up-regulation of HIF-1 α in osteoclasts of postmenopausal osteoporosis. **Results** Metabolism product of mouse bone tissue of B group were higher than A group ($P<0.001$). The positive expression of HIF-1-alpha protein was found in osteoclasts, and the expression of HIF-1-alpha protein in bone marrow region was higher than that in A group ($P<0.001$), while the change of HIF-1 β , PHD, VHL, and FIH were not obviously. After the HIF-1 α inhibitor treatment, markers of bone resorption of bone metabolism in ovariectomized mice reduced and the osteoporosis got greatly relieved ($P<0.001$). HIF-1 α expression was down-regulated in osteoclasts of OVX-mice after treated with inhibitors of ERK, Akt and NF- κ B signaling pathways ($P<0.05$). **Conclusion** HIF-1 signaling pathway get

^{*} 教育部博士点新教师类基金(No. 20120181120025)资助

△ 通信作者, E-mail: huangqiang4325@126.com

involved in the pathological evolution of osteoporosis after menopause, and inhibition of HIF-1 can significantly improve the severity of osteoporosis after menopause. ERK, Akt and NF- κ B signaling pathways may involve in the up-regulation of HIF-1 signaling pathway in osteoclasts of PMOP.

【Key words】 Ovariectomy Osteoporosis HIF-1 α Osteoclast

低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)信号通路对骨形成和骨吸收都有重要作用,该信号通路上调一方面可通过成血管成骨偶联促进骨形成和血管形成^[1];而另一方面又可增加破骨细胞的数量及破骨活性^[2]。HIF-1 具有 HIF-1 α 、HIF-1 β 两个亚基,其中 HIF-1 α 蛋白水平是 HIF-1 信号通路活性的决定性因素^[3]。绝经后骨质疏松(postmenstrual osteoporosis, PMOP)为原发性骨质疏松的一种,约 40% 的绝经后女性患有 PMOP,雌激素缺乏是 PMOP 发生的首要原因^[4]。查阅文献我们发现 PMOP 中某些因子或信号通路的改变可能会对 HIF-1 信号通路的活性造成一定的影响。有文献报道,活性氧(reactive oxygen species, ROS)是 HIF-1 α 降解的调节因子^[5],而细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF κ B)、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)的激活均会导致 HIF-1 α 合成增加^[6-11],这几种因子在 PMOP 中均有变化;此外有文献报道骨组织微环境中发生变化的与骨吸收效应有关的细胞因子,如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1(interleukin-1, IL-1)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)等也可以在某些环境下通过不同的机制调节 HIF-1 α 的合成和降解^[3],而恰巧雌激素可以调节这些细胞因子的合成^[12-14]。基于此,我们猜测 HIF-1 信号通路可能会参与 PMOP 发生的过程。

本研究旨在初步探索 HIF-1 信号通路在 PMOP 中是否发挥作用及如何发挥作用,从而更加深入地理解 PMOP 的发病机理,为 PMOP 的治疗提供新的视角和靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4 月龄 C57BL/6J 近交系雌性小鼠 60 只,体重 23~25 g,由四川大学实验动物中心提供,随机分 A 组(假手术组,Sham 组)、B 组(去卵巢绝经后骨质疏松组)、C 组(溶剂对照组)、D 组[HIF-12 抑制剂 2-甲氧雌二醇(2ME2 治疗组)]各 15 只。

1.2 主要试剂

0.5% 苯巴比妥钠溶液,体积分数为 4% 的多聚甲醛溶液,0.5% 二甲基亚砷(DMSO)溶液,抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒(Sigma),小鼠 I 型前胶原氨基末端肽(PINP)ELISA 试剂盒(Cloud-Clone Corp),小鼠 I 型胶原羧基末端肽(CTX-1)ELISA 试剂盒(ABL),HIF-1 α 抗体、脯氨酰羟化酶结构域蛋白(PHD)抗体、Hippel-Lindau 肿瘤抑制蛋白(VHL)抗体和低氧诱导因子抑制因子(FIH)抗体(Santa),HIF-1 β 抗体(Abcam),DAB 显色剂和生物素化二抗试剂盒(中杉金桥),2ME2 (Selleck,选择性抑制 HIF-1 α ^[15],常规剂量下不会激活雌激素受体产生雌激素效应^[16],因 2ME2 几乎不溶于水,所以需要使用有机溶剂 DMSO),胎牛血清(FBS, Cyagen Biosciences), α -MEM 培养基(GIBCO),青链霉素(Hyclone),重组小鼠可溶性核因子 κ B 受体活化因子配体(RANKL)蛋白(R&D),重组小鼠可溶性巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)蛋白(PeproTech),SB 203580 和 Gliotoxin(Abcam),LY294002(CST)。

1.3 动物模型的建立及标本采集

A 组行假手术,切除卵巢周围部分脂肪后缝合,B 组、C 组、D 组行双侧卵巢切除术(OVX),结扎止血后缝合。C、D 组伤口愈合后腹腔注射给药,D 组以 30 mg/(kg·d)的剂量给予 2ME2,C 组给予等体积的 0.5% DMSO 溶液,最终 DMSO 注射量 $\leq$ 100 μ L/kg;A、B 组注入等量生理盐水。3 月后脱颈处死小鼠取材。心脏取血 0.5 mL,留待 ELISA 检测。仔细解剖第五腰椎,去除周围软组织,保存于体积分数为 4% 的多聚甲醛溶液中,留待 HE 染色、TRAP 染色和免疫组化检测(免疫组化染色检测 HIF-1 信号通路代谢的主要指标 HIF-1 α 、HIF-1 β 、PHD、VHL 及 FIH)。A、B 组小鼠分离股骨胫骨,提取骨髓以培养破骨细胞。

1.4 检测项目和方法

1.4.1 ELISA 检测血清雌激素及骨代谢指标 按照常规方法进行血清雌激素、小鼠成骨指标 PINP 及小鼠骨吸收指标 CTX-1 的 ELISA 检测。

1.4.2 HE 染色腰椎 体积分数为 4% 的多聚甲醛

固定 24 h 后,将第五腰椎用乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)脱钙 3 周,石蜡包埋后 6 μm 切片,按照常规操作方法进行第五腰椎 HE 染色,光镜下观察骨小梁数量(Tb. N)及厚度(Tb. Th)变化情况。

1.4.3 小鼠腰椎破骨细胞 TRAP 染色 第五腰椎脱钙切片后,按照 TRAP 试剂盒说明书行破骨细胞 TRAP 染色,水性封片剂封片后,应用 IPP6.0 分析图像,每张切片选取 5 个不同视野,以被染成酒红色的破骨细胞为阳性信号,计算观察单位骨周径破骨细胞数(N. Oc/B. Pm)及破骨细胞覆盖百分比(Oc. S/BS)。

1.4.4 免疫组化检测小鼠腰椎组织中 HIF-1 α 、HIF-1 β 、PHD、VHL 及 FIH 蛋白的表达 石蜡切片常规脱蜡至水,0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲液(pH6.0)加热至 85 $^{\circ}\text{C}$,5 min 后降温到 80 $^{\circ}\text{C}$ 维持 5 min,逐渐冷却抗原修复后,3% H_2O_2 孵育 8 min,滴加山羊血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;滴加新鲜配制的相应一抗试剂(均为 1:50)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,阴性对照加等量 PBS;滴加生物素化二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min;滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液孵育 30 min。DAB 显色,苏木素复染 10 min,脱水后中性树脂封片。观察成骨细胞、破骨细胞中目的蛋白的表达变化;采用 IPP6.0 分析骨髓区目的蛋白的光密度值;每个标本均选取 5 个视野,取平均值。

1.4.5 破骨细胞的培养与鉴定 A 组和 B 组小鼠脱颈处死后酒精浸泡 5 min,按照文献方法^[17]分离股骨胫骨,提取骨髓进行细胞增殖后诱导培养,细胞增殖使用含 10%FBS、1%青链霉素、20 ng/mL M-CSF 的无酚红 α -MEM 培养液,诱导使用含 20 ng/mL M-CSF 及 50 ng/mL RANKL 的无酚红 α -MEM 培养基(含 10%FBS、1%青链霉素),光镜下观察到明显的多核融合细胞后,体积分数为 4%的

多聚甲醛室温下固定细胞 20 min,然后按照 TRAP 染色试剂盒说明书配制溶液,进行破骨细胞 TRAP 染色,观察到体积大、形态多不规则、有伪足和褶皱、包浆丰富、被染成淡紫色到暗红色的细胞即为破骨细胞。

1.4.6 Akt、ERK、NF- κ B 信号通路抑制剂处理细胞后 Western blot 检测破骨细胞内 HIF-1 α 蛋白水平变化 取出 RANKL 诱导第 6 天的 A 组和 B 组小鼠破骨细胞,B 组细胞分别加入 30 $\mu\text{mol/L}$ LY294002(PI3K-Akt 信号通路抑制剂)、10 $\mu\text{mol/L}$ SB 203580(MAPK/ERK 信号通路抑制剂)和 30 ng/mL Gliotoxin(NF κ B 信号通路抑制剂)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%的 CO_2 培育箱静置孵育 3 h,以 A 组破骨细胞作为对照。3 h 后收集样本细胞冰上裂解提取细胞总蛋白,使用 BCA 法测定样本蛋白浓度,以每泳道 40 μg 蛋白等量上样后,电泳、转膜,室温封闭 1 h。一抗工作浓度 1:500,二抗兔抗鼠 IgG,内参为 GAPDH,进行 Western blot 检测。显影结果使用 Image J 2X 软件进行分析处理,以目标条带灰度值与内参条带灰度值之比为目标蛋白相对表达量。

1.5 统计学方法

所用数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用两样本均数 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清雌激素和骨代谢指标的变化

ELISA 结果显示(表 1),A 组小鼠血清雌激素水平较 B 组升高,PINP、CTX-1 水平较 B 组降低,差异均有统计学意义($P<0.001$)。D 组小鼠血清 PINP、CTX-1 分别较 B、C 组降低,差异均有统计学意义($P<0.001$)。B 组与 C 组小鼠间各指标差异均无统计学意义。

表 1 各组小鼠 E2、PINP、CTX-1、N. Oc/B. Pm 和 Oc. S/BS 结果
Table 1 Levels of E2, PINP, CTX-1, N. Oc/B. Pm and Oc. S/BS of mice in each group

Index	A group (n=15)	B group (n=15)	C group (n=15)	D group (n=15)
E2/(pg/mL)	38.28 $\pm$ 3.24	19.51 $\pm$ 2.73*	19.41 $\pm$ 2.65	19.55 $\pm$ 2.20
PINP/(ng/mL)	51.42 $\pm$ 3.08	58.63 $\pm$ 3.38*	56.13 $\pm$ 2.47	48.06 $\pm$ 2.94 Δ
CTX-1/(pg/mL)	11.79 $\pm$ 1.39	21.17 $\pm$ 2.03*	20.43 $\pm$ 1.69	12.97 $\pm$ 1.26 Δ
(N. Oc/B. Pm)/mm ⁻¹	5.23 $\pm$ 1.19	12.31 $\pm$ 2.29*	11.77 $\pm$ 1.83	6.09 $\pm$ 1.28 Δ
(Oc. S/BS)/%	7.38 $\pm$ 1.46	17.24 $\pm$ 3.03*	15.14 $\pm$ 1.85	8.71 $\pm$ 1.92 Δ

* $P<0.001$, vs. A group; Δ $P<0.001$, vs. B and C groups. A: Sham-operation group; B: Ovariectomized PMOP group; C: Control group; D: Ovariectomized+2ME2 group

2.2 各组小鼠腰椎 HE 染色结果

腰椎骨小梁 HE 染色结果显示(图 1),与 A 组

相比,B 组小鼠骨小梁数量(Tb. N)减少,厚度(Tb. Th)减小;与 B、C 组相比,D 组小鼠骨小梁数量

(Tb. N)增加,厚度(Tb. Th)增加。

2.3 各组小鼠腰椎破骨细胞的变化

腰椎破骨细胞 TRAP 染色结果显示(图 2、表 1),B 组单位骨周径破骨细胞数和破骨细胞覆盖百分比均较 A 组升高,差异有统计学意义($P<0.001$);D 组单位骨周径破骨细胞数和破骨细胞覆盖百分比比较 B、C 组降低,差异有统计学意义($P<0.001$)。B 组与 C 组间各指标差异均无统计学意义。

2.4 各组小鼠腰椎 HIF-1 信号通路代谢指标蛋白的表达变化

免疫组化染色结果显示(图 3、表 2),A 组成骨细胞及破骨细胞 HIF-1 α 阴性表达,B 组成骨细胞 HIF-1 α 仍为阴性表达,但破骨细胞 HIF-1 α 阳性表达(浅红色、棕黄色、棕褐色均为阳性,胞浆胞核均有表达);与 A 组比较,B 组骨髓区 HIF-1 α 表达增加,差异有统计学意义($P<0.001$)。D 组成骨细胞及破骨细胞 HIF-1 α 阴性表达,骨髓区 HIF-1 α 表达降

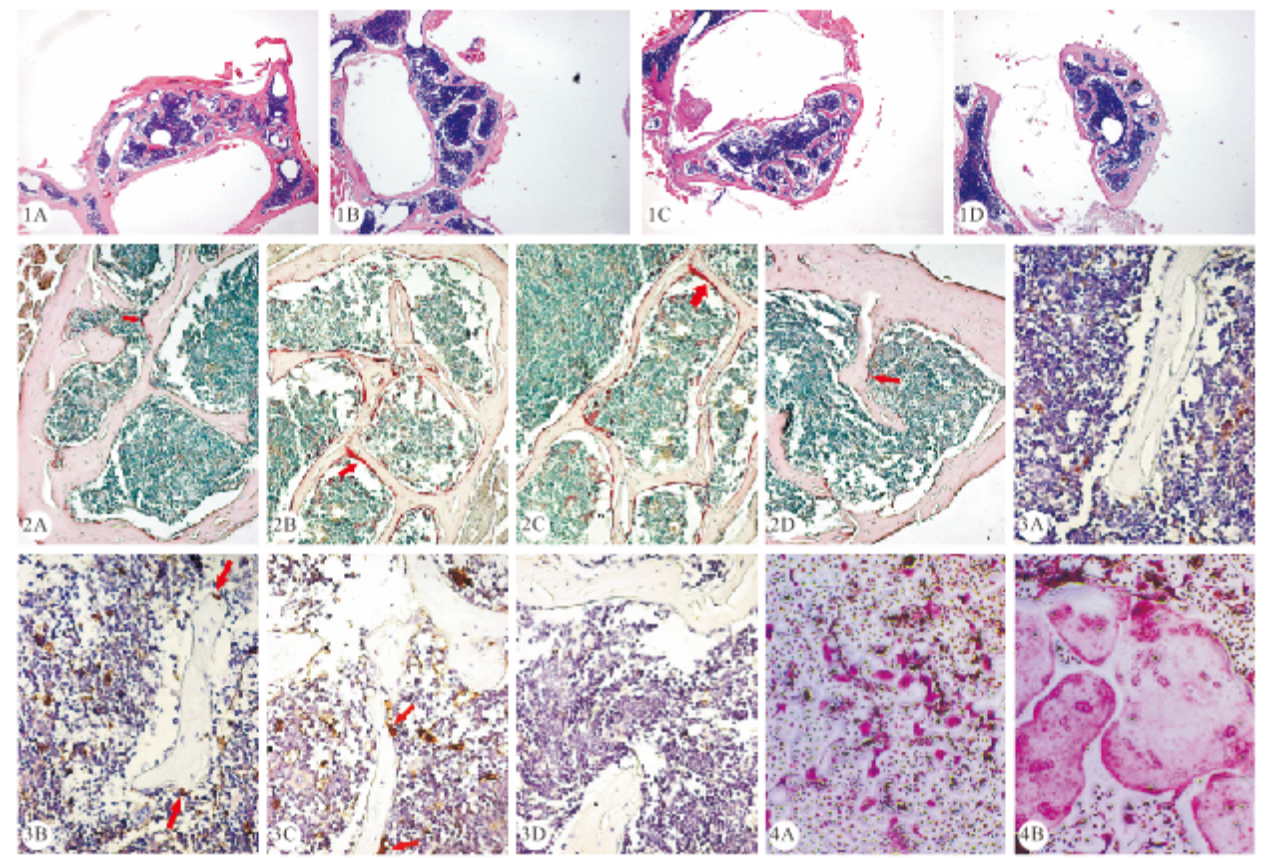


图 1 小鼠腰椎 HE 染色。×10 图 2 小鼠腰椎 TRAP 染色(箭头示 TRAP 染色阳性破骨细胞)。×20 图 3 小鼠腰椎免疫组化染色(箭头示骨小梁表面的 HIF-1 α 阳性具有多个细胞核的破骨细胞)。SP ×40 图 4 骨髓诱导小鼠破骨细胞 TRAP 染色。×100

Fig 1 Sections of mice lumbar vertebra stained with hematoxylin and eosin (HE). ×10 Fig 2 Sections of mice lumbar vertebra stained with tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) [arrows show TRAP (+) osteoclasts]. ×20 Fig 3 Sections of mice lumbar vertebra stained with immuno-histochemical staining [arrows show HIF-1 α (+) osteoclasts at surface of trabecula bone]. SP ×40 Fig 4 Osteoclasts derived from mice bone marrow stained with tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). ×100

A: A group; B: B group; C: C group; D: D group

表 2 各组小鼠骨髓区 HIF-1 α 及 HIF-1 β 、PHD、VHL、FIH 阳性蛋白光密度比较

Table 2 Comparison of optic density values(ODV) on HIF-1 α , HIF-1 β , PHD, VHL and FIH in bone marrow of mice in all groups				
Index	A group (n=15)	B group (n=15)	C group (n=15)	D group (n=15)
HIF-1 α	0.007 5 $\pm$ 0.001 0	0.014 0 $\pm$ 0.002 2*	0.012 1 $\pm$ 0.002 3	0.001 0 $\pm$ 0.000 3 Δ
HIF-1 β	0.066 3 $\pm$ 0.011 0	0.067 5 $\pm$ 0.009 4	0.070 2 $\pm$ 0.011 1	0.060 1 $\pm$ 0.010 3
PHD	0.076 4 $\pm$ 0.013 9	0.744 0 $\pm$ 0.015 6	0.075 3 $\pm$ 0.014 9	0.070 9 $\pm$ 0.014 3
VHL	0.083 6 $\pm$ 0.034 3	0.079 3 $\pm$ 0.038 9	0.071 2 $\pm$ 0.023 6	0.082 5 $\pm$ 0.018 2
FIH	0.176 0 $\pm$ 0.613 0	0.156 0 $\pm$ 0.071 5	0.164 0 $\pm$ 0.070 6	0.175 0 $\pm$ 0.080 8

* $P<0.001$, vs. A group; Δ $P<0.001$, vs. B and C groups

低,与 B、C 组比较差异有统计学意义($P<0.001$)。B 组与 C 组间骨髓区 HIF-1 α 表达差异无统计学意义。成骨细胞、破骨细胞及骨髓区 HIF-1 β 、PHD、VHL 和 FIH 的表达在各组间无明显变化。

2.5 破骨细胞的鉴定

诱导 6 d 后,对细胞进行 TRAP 染色,光镜下可观察到融合细胞胞质被染成淡紫色,此即为 TRAP 阳性的破骨细胞。而且可以发现 B 组破骨细胞的

数量较 A 组多(图 4)。

2.6 Akt、ERK、NF- κ B 信号通路抑制后破骨细胞内 HIF-1 α 蛋白表达的变化

Western blot 检测结果显示(图 5),B 组小鼠破骨细胞内 HIF-1 α 蛋白量较 A 组小鼠破骨细胞内 HIF-1 α 蛋白量增多($P<0.05$),而加入 MAPK/ERK、NF- κ B、PI3K-Akt 信号通路抑制剂处理后,B 组小鼠破骨细胞内 HIF-1 α 蛋白量均降低($P<0.05$)。

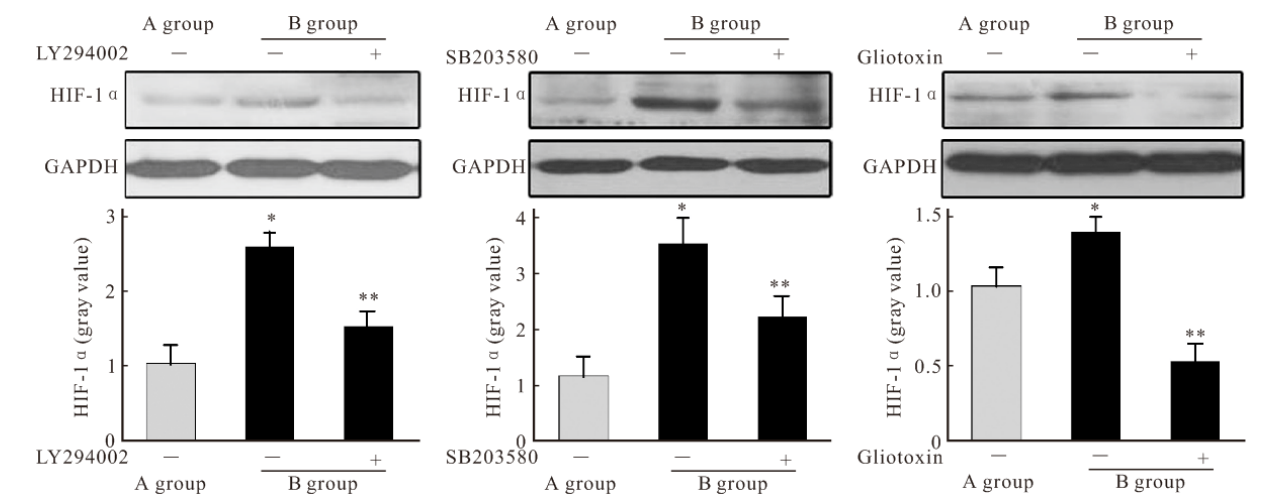


图 5 抑制 PI3K-Akt、MAPK/ERK、NF- κ B 信号通路后破骨细胞内 HIF-1 α 蛋白表达量的变化

Fig 5 Analysis of level of HIF-1 α in osteoclasts after treated with inhibitors of PI3K-Akt, MAPK/ERK and NF- κ B signaling pathways
* $P<0.05$, vs. A group; * * $P<0.05$, vs. B group without inhibitors

3 讨论

3.1 破骨细胞中 HIF-1 α 水平、破骨活性及骨量变化

HIF-1 α 促进破骨细胞形成、增强破骨活性的重要作用已经被广泛证明^[2,18-20]。KNOWLES 等^[2,21]在细胞培养中证实了 HIF-1 α 对破骨细胞增殖及破骨活性的促进作用,认为血管生成素样蛋白 4(ANGPTL4)在此机制中有重要的介导作用,而且认为低氧促进破骨细胞形成、增强破骨活性是以 HIF-1 α 依赖的方式进行的。INDO 等^[19]的研究也表明 HIF-1 α 在破骨细胞分化及破骨活性方面的正性调节作用,他们认为 HIF-1 α 在能量代谢,如促进糖摄取、增强糖酵解方面的作用在此过程中至关重要。还有研究表明,HIF-1 信号通路的重要下游因子血管内皮细胞生长因子(VEGF)自分泌及旁分泌作用于破骨细胞促进破骨细胞形成、增强破骨活性^[18,20]。

本研究也证实,去卵巢小鼠破骨细胞中 HIF-1 α 水平升高,骨代谢破骨指标 CTX-1 升高,骨质疏松

发生;去卵巢小鼠予 HIF-1 α 抑制剂 2ME2 后破骨细胞中 HIF-1 α 水平降低,骨代谢破骨指标降低,骨质疏松程度减轻。这证明 HIF-1 α 参与 PMOP 发生发展的病理过程,具有促骨质疏松作用。而与假手术组相比,去卵巢小鼠 PHD、VHL 及 FIH 水平均无明显变化,表明破骨细胞中 HIF-1 α 信号通路上调可能不是通过此三者含量改变实现的。

3.2 成骨细胞中 HIF-1 α 水平及成骨活性变化

本研究结果显示,假手术组及去卵巢绝经后骨质疏松组成骨细胞 HIF-1 α 均阴性表达。既往也尚未有雌激素直接对成骨细胞 HIF-1 α 水平影响的研究报道。薯蓣皂苷配基(Diosgenin)具有雌激素类似的作用^[22],YEN 等^[23]的研究表明薯蓣皂苷配基可以提高成骨细胞中 HIF-1 α 水平,其机制与 Akt 和 MAPK 通路的激活有关,但这并不能说明雌激素一定有类似的作用。本研究中 HIF-1 α 阴性表达结果也可能与检测方法的敏感度有关,有待进一步研究。

去卵巢小鼠给予 HIF-1 α 抑制剂后骨代谢成骨指标 PINP 降低,其原因之一为破骨活性受到抑制

后,骨吸收-形成偶联介导的成骨活性随之下降,另一方面也可能与成骨细胞自身 HIF-1 信号通路受到抑制导致的负性调节有关^[1]。

3.3 骨髓区 HIF-1 α 水平变化

在骨髓部位,因各种细胞的混杂不规律分布,我们仅仅进行了 HIF-1 α 总体水平的检测,结果显示去卵巢后小鼠骨髓区 HIF-1 α 水平升高,予 HIF-1 α 抑制剂后 HIF-1 α 水平降低。不同细胞的 HIF-1 α 改变引起不同的效应,促进或改善骨质疏松。单核/巨噬破骨前体细胞中 HIF-1 α 的上调会促进其向破骨细胞分化^[20,24];间充质干细胞中 HIF-1 α 的上调会促进其向成骨细胞分化^[25-26],但间充质干细胞的定位目前仍有争议^[27]。但何种细胞 HIF-1 α 发生了改变,具体是什么改变? 本研究尚不能确定。

3.4 抑制 MAPK/ERK、NF κ B 以及 PI3K-Akt 信号通路后破骨细胞内 HIF-1 α 水平变化

有关去卵巢小鼠破骨细胞内 HIF-1 α 蛋白水平的研究仍非常少,其水平上调的机制仍不清楚。目前对于细胞内 HIF-1 α 蛋白水平调节的研究,主要集中在 HIF-1 α 的合成和降解两方面。有关 HIF-1 α 合成方面的研究和文献目前还比较少,ZHOU 等^[28]在给予相关信号通路抑制剂后,通过检测³⁵S 标记的 HIF-1 α 蛋白含量,证实了在猪近端肾小管细胞系 LLC-PK1 细胞中,TNF- α 可在翻译水平上通过 PI3K-Akt、MAPK/ERK 和 NF κ B 信号通路上调增加 HIF-1 α 蛋白的合成,抑制这 3 条信号通路后均可使 HIF-1 α 蛋白合成降低。ALAM 等^[29]的研究结果表明,在颗粒细胞中卵泡刺激素(FSH)可通过 Akt 信号通路的上调促进 HIF-1 α 蛋白的合成。JUNG 等^[30]通过培养人肺腺癌 A549 细胞系,证实 HIF-1 α 是连接炎症反应和肿瘤之间的一个重要的转录因子,其主要机制是 IL-1 通过上调 Akt 和 NF κ B 信号通路,增加 HIF-1 α 的合成。而在对小鼠单核细胞白血病细胞 RAW264.7 的研究中,TREBEC-REYNOLDS 等^[31]证明了上调 NF κ B 信号通路可以促进 HIF-1 α 的合成,NISHI 等^[32]证实内毒素可通过激活 Akt 和 ERK 信号通路增加细胞内 HIF-1 α 的合成。综合上述现有其他不同细胞内有关 HIF-1 α 合成的研究,我们可以发现,PI3K-Akt、MAPK/ERK 和 NF κ B 信号通路均对 HIF-1 α 蛋白的合成有着重要调节作用。有研究表明,绝经后破骨细胞内 Akt、ERK、NF κ B 这 3 条信号通路均上调^[33-34]。由此,我们推测绝经后骨质疏松骨组织破骨细胞中 HIF-1 α 水平的上调可能是通过 Akt、

ERK 和 NF κ B 信号通路中某条或几条联合作用的结果。本研究的 Western blot 结果也证实了这一推测,但其具体调节机制仍有待进一步探究。

综上所述,HIF-1 信号通路参与了小鼠绝经后骨质疏松的病理演变过程,抑制 HIF-1 信号通路可改善绝经后骨质疏松的严重程度,绝经后骨质疏松破骨细胞内 HIF-1 信号通路的上调可能与 Akt、ERK、NF κ B 这 3 条信号通路有关,其确切的分子机制仍有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] WANG Y, WAN C, DENG L, *et al.* The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest*, 2007, 117(6): 1616-1626.
- [2] KNOWLES HJ, CLETON-JANSEN AM, KORSCHING E, *et al.* Hypoxia-inducible factor regulates osteoclast-mediated bone resorption: role of angiopoietin-like 4. *FASEB J*, 2010, 24(12):4648-4659.
- [3] ZHOU J, BRÜNE B. Cytokines and hormones in the regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2006, 4(3):189-197.
- [4] RACHNER TD, KHOSLA S, HOFBAUER LC. Osteoporosis: now and the future. *Lancet*, 2011, 377(9773): 1276-1287.
- [5] MANSFIELD KD, GUZY RD, PAN Y, *et al.* Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF-alpha activation. *Cell Metab*, 2005, 1(6):393-399.
- [6] REILING JH, SABATINI DM. Stress and mTOR signaling. *Oncogene*, 2006, 25(48):6373-6383.
- [7] SONENBERG N, HINNEBUSCH AG. New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Mol Cell*, 2007, 28(5):721-729.
- [8] RUVINSKY I, SHARON N, LERER T, *et al.* Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev*, 2005, 19(18):2199-2211.
- [9] FLÜGEL D, GÖRLACH A, MICHIELS C, *et al.* Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1alpha and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(9):3253-3265.
- [10] TANG TT, LASKY LA. The forkhead transcription factor FOXO4 induces the down-regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha by a von Hippel-Lindau protein-independent mechanism. *J Biol Chem*, 2003, 278(32):30125-30135.
- [11] EMERLING BM, WEINBERG F, LIU JL, *et al.* PTEN regulates p300-dependent hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activity through Forkhead transcription factor 3a (FOXO3a). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(7): 2622-2627.

- [12] GAO Y, QIAN WP, DARK K, *et al.* Estrogen prevents bone loss through transforming growth factor beta signaling in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(47):16618-16623.
- [13] SANYAL A, HOEY KA, MÖDDER UI, *et al.* Regulation of bone turnover by sex steroids in men. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(5):705-714.
- [14] IQBAL J, SUN L, KUMAR TR, *et al.* Follicle-stimulating hormone stimulates TNF production from immune cells to enhance osteoblast and osteoclast formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(40):14925-14930.
- [15] SCHAIBLE EV, WINDSCHÜGL J, BOBKIEWICZ W, *et al.* 2-Methoxyestradiol confers neuroprotection and inhibits a maladaptive HIF-1 α response after traumatic brain injury in mice. *J Neurochem*, 2014, 129(6):940-954.
- [16] STUBELIUS A, ANDRÉASSON E, KARLSSON A, *et al.* Role of 2-methoxyestradiol as inhibitor of arthritis and osteoporosis in a model of postmenopausal rheumatoid arthritis. *Clin Immunol*, 2011, 140(1):37-46.
- [17] 周 龙, 陈 曦, 罗宗平, 等. C57BL/6 小鼠骨髓单核细胞分离、培养、纯化及向破骨细胞的分化. *中国组织工程研究*, 2015, 19(6):940-944.
- [18] KNOWLES HJ, ATHANASOU NA. Hypoxia-inducible factor is expressed in giant cell tumour of bone and mediates paracrine effects of hypoxia on monocyte-osteoclast differentiation via induction of VEGF. *J Pathol*, 2008, 215(1):56-66.
- [19] INDO Y, TAKESHITA S, ISHII KA, *et al.* Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(11):2392-2399.
- [20] MIYAUCHI Y, SATO Y, KOBAYASHI T, *et al.* HIF1 α is required for osteoclast activation by estrogen deficiency in postmenopausal osteoporosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(41):16568-16573.
- [21] KNOWLES HJ, ATHANASOU NA. Acute hypoxia and osteoclast activity: a balance between enhanced resorption and increased apoptosis. *J Pathol*, 2009, 218(2):256-264.
- [22] SCOTT A, HIGDON K, TUCCI M, *et al.* The prevention of osteoporotic progression by means of steroid loaded TCPL drug delivery systems. *Biomed Sci Instrum*, 2001, 37:13-18.
- [23] YEN ML, SU JL, CHIEN CL, *et al.* Diosgenin induces hypoxia-inducible factor-1 activation and angiogenesis through estrogen receptor-related phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts. *Mol Pharmacol*, 2005, 68(4):1061-1073.
- [24] HIRAGA T, KIZAKA-KONDOH S, HIROTA K, *et al.* Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer. *Cancer Res*, 2007, 67(9):4157-4163.
- [25] 付志杰, 张巨峰, 王大平, 等. 携带低氧诱导因子 1 α 慢病毒感染大鼠骨髓间充质干细胞后成骨基因的表达. *中国组织工程研究*, 2014, 18(26):4455-4462.
- [26] LIU Y, BERENDSEN AD, JIA S, *et al.* Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *J Clin Invest*, 2012, 122(9):3101-3113.
- [27] SACCHETTI B, FUNARI A, MICHENZI S, *et al.* Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*, 2007, 131(2):324-336.
- [28] ZHOU J, CALLAPINA M, GOODALL GJ, *et al.* Functional integrity of nuclear factor kappaB, phosphatidylinositol 3'-kinase, and mitogen-activated protein kinase signaling allows tumor necrosis factor alpha-evoked Bcl-2 expression to provoke internal ribosome entry site-dependent translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Clin Oncol*, 2004, 22(14):2790-2799.
- [29] ALAM H, MAIZELS ET, PARK Y, *et al.* Follicle-stimulating hormone activation of hypoxia-inducible factor-1 by the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/Ras homolog enriched in brain (Rheb)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway is necessary for induction of select protein markers of follicular differentiation. *J Biol Chem*, 2004, 279(19):19431-19440.
- [30] JUNG YJ, ISAACS JS, LEE S, *et al.* IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J*, 2003, 17(14):2115-2117.
- [31] TREBEC-REYNOLDS DP, VORONOV I, HEERSCHJE JN, *et al.* VEGF-A expression in osteoclasts is regulated by NF-kappaB induction of HIF-1alpha. *J Cell Biochem*, 2010, 110(2):343-351.
- [32] NISHI K, ODA T, TAKABUCHI S, *et al.* LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(5):983-995.
- [33] SUN L, PENG Y, SHARROW AC, *et al.* FSH directly regulates bone mass. *Cell*, 2006, 125(2):247-60.
- [34] GENG W, YAN X, DU H, *et al.* Immunization with FSH β fusion protein antigen prevents bone loss in a rat ovariectomy-induced osteoporosis model. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 434(2):280-286.

(2017-04-21 收稿, 2017-08-27 修回)

编辑 余 琳