

·基础研究·

脉冲电磁场对卵巢切除大鼠骨组织活化T细胞核因子2和空泡型V-ATP酶mRNA表达的影响*

黄煦格^{1,2} 何剑全¹ 陈健^{1,3} 王潇¹ 黄慧¹

摘要

目的:探讨脉冲电磁场(pulsed electromagnetic fields, PEMF)对卵巢切除(ovariectomized, OVX)大鼠骨组织细胞核因子 κ B受体活化因子(receptor activator of NF- κ B, RANK),活化T细胞核因子2(nuclear factor of activated T2, NFAT2)和空泡型V-ATP酶(vacuolar H⁺-ATPase, V-ATP)表达的影响。

方法:将48只SD大鼠随机分为假手术组(SHAM),卵巢切除组(OVX),卵巢切除+脉冲电磁场治疗组(OVX+PEMF)。OVX+PEMF组大鼠在频率8Hz,磁场强度3.8mT的PEMF下每天干预40min,干预8周和16周后检测大鼠骨密度和骨组织RANK, NFAT2和V-ATP的mRNA表达水平。

结果:OVX组BMD在第8周($P<0.05$)和第16周($P<0.001$)均低于SHAM组。SHAM组与OVX组比较,8周时RANK表达 $P>0.05$,而SHAM组NFAT2与V-ATP表达均低于OVX组($P<0.05$, $P<0.01$);16周时RANK、NFAT2、V-ATP在OVX组表达升高(均 $P<0.01$)。SHAM组与OVX+PEMF组比较,8周时两组RANK、NFAT2、V-ATP表达 $P>0.05$;16周时OVX+PEMF组RANK和NFAT2表达均高于SHAM组(均 $P<0.01$),而两组V-ATP表达 $P>0.05$ 。OVX组与OVX+PEMF组相比,8周时两组RANK和V-ATP表达均 $P>0.05$,OVX+PEMF组NFAT2表达低于OVX组($P<0.05$);第16周时两组RANK表达 $P>0.05$,NFAT2和V-ATP在OVX+PEMF组的表达均下降($P<0.01$, $P<0.05$)。

结论:PEMF可通过下调OVX大鼠骨组织中NFAT2和V-ATPmRNA的表达从而抑制破骨细胞的骨吸收,进而延缓OVX大鼠的骨丢失。

关键词 脉冲电磁场,细胞核因子 κ B受体活化因子;活化T细胞核因子2;空泡型V-ATP

中图分类号:R681,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2018)-08-0896-05

Effects of pulsed electromagnetic fields on the expression of NFAT2 and V-ATP mRNA in the bone of ovariectomized rats/HUANG Xuge, HE Jianquan, CHEN Jian, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(8): 896—900

Abstract

Objective: To investigate the effect of Pulsed electromagnetic fields (PEMF) on the mRNA expression of Receptor activator of NF- κ B (RANK), Nuclear factor of activated T2 (NFAT2) and Vacuolar H⁺-ATPase(V-ATP) in the bone of ovariectomized(OVX) rats.

Method: Forty eight Sprague-Dawley rats were randomly divided into SHAM group, OVX group and OVX+PEMF group. The rats in OVX+PEMF group were treated in 8Hz and 3.6 mT PEMF for 40 minutes once a day. The level of Bone mineral density (BMD) was detected after intervention. Moreover, the mRNA expression of RANK, NFAT2 and V-ATP in bone were tested in every group at 8th and 16th weeks respectively.

Result: The BMD of OVX group was lower than that of SHAM group at the 8th week ($P<0.05$) and the 16th week ($P<0.001$). Comparison between SHAM group and OVX group at the 8th week, there was no signif-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.08.004

*基金项目:国家自然科学基金(81272168);福建省自然科学基金(2016J01623,2017J01375);福建省卫生计生委青年科研课题(2015-2-45)

1 厦门大学附属中山医院康复医学科,厦门,361004; 2 广州中医药大学第一临床医学院; 3 通讯作者

作者简介:黄煦格,女,医师; 收稿日期:2018-01-30

ificant difference in the expression of RANK mRNA ($P>0.05$), while the expression of NFAT2 and V-ATP were increased in OVX group ($P<0.05$, $P<0.01$). Furthermore, the expressions of RANK, NFAT2 and V-ATP in OVX group were higher than those in SHAM group at the 16th week (all $P<0.01$). The mRNA expressions of RANK, NFAT2 and V-ATP had no significant changes between SHAM group and OVX+PEMF group at the 8th week ($P>0.05$). At the 16th week, the expressions of RANK and NFAT2 in OVX+PEMF group were higher than those in SHAM group (all $P<0.01$), but no significant difference for the expression of V-ATP ($P>0.05$). Compared to OVX group and OVX+PEMF group, the mRNA expressions of RANK and V-ATP at 8th weeks had no difference ($P>0.05$). However, the expression of NFAT2 was down-regulated in OVX+PEMF group ($P<0.05$). The RANK expression of the two groups had no change at the 16th week ($P>0.05$), while the expressions of NFAT2 and V-ATP were decreased in OVX+PEMF group ($P<0.01$, $P<0.05$).

Conclusion: PEMF can reduce the bone resorption of osteoclasts by down-regulating the mRNA expressions of NFAT2 and V-ATP, and then delay bone loss in OVX rats.

Author's address Department of Rehabilitation, Zhongshan Hospital Xiamen University, Xiamen Fujian, 361004, P.R.China.

Key word pulsed electromagnetic fields, RANK, NFAT2, V-ATP

破骨细胞(osteoclast, OC)在骨重建过程中发挥至关重要的作用,细胞核因子 κ B受体活化因子(receptor activator of NF- κ B, RANK),细胞核因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, RANKL)和骨保护素(osteoprotegerin, OPG)三者间相互共同作用形成 OPG/RANK/RANKL 系统,调节 OC 的形成、活化和分化^[1]。钙调节磷酸酶(Calcineurin, CN)/活化 T 细胞核因子信号通路(nuclear factor of activated T cells, NFAT)与 OPG/RANK/RANKL 系统密切相关的重要的信号传导途径^[2]。NFAT2 作为 NFAT 家族的成员之一,在 CN 的调控下,是 OC 分化过程中最强的转录因子^[3]。成熟 OC 通过空泡型 V-ATP 酶(vacuolar H⁺-ATPase, V-ATP)的作用溶解骨的无机成分,将 H⁺分泌到局部环境中从而包围并酸化骨组织边界^[4],造成骨吸收。

脉冲电磁场(pulsed electromagnetic fields, PEMF)抗骨质疏松症(osteoporosis, OP)的有效性得到了动物实验和临床研究的证实^[5-6]。然而,PEMF 抑制 OC 骨吸收的分子机制尚未完全阐明。本实验通过观察 PEMF 对卵巢切除(ovariectomized, OVX)大鼠骨组织 NFAT2, RANK 和 V-ATP mRNA 表达的影响,研究 PEMF 抗骨质疏松的分子生物学机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

3 月龄雌性 SPF 级 SD 大鼠 48 只,体质量 185 ± 6 g,由厦门大学医学院实验动物中心提供(证书编号:2007-0005)。动物饲养环境通风良好,温度设置 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$,湿度 70%,12—12 间隔照明。本动物实验伦理经厦门大学中山医院医学伦理委员会批准。

1.2 主要材料与仪器

Trizol(美国 Invitrogen 公司),Taq DNA 聚合酶和 dNTPs(中国宝生物工程(大连)有限公司),第一链 cDNA 合成试剂盒(立陶宛 MBI 公司),PCR 引物和探针(中国上海生物工程研究中心),脉冲电磁场骨质疏松治疗仪 UNION-2000A(中国医学科学院生物医学工程研究所)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制备及分组情况:按随机分配原则将 48 只大鼠随机分配为假手术组(SHAM)、卵巢切除术组(OVX)、卵巢切除术组+脉冲电磁场治疗组(OVX+PEMF),每组 16 只。除 SHAM 组外,其余 2 组均在麻醉和无菌的状态下切除双侧卵巢造模。SHAM 组大鼠仅切除双侧卵巢周围少量脂肪组织,但不切除卵巢。使用青霉素预防感染,1 次/d,连续 3d。术后 3d,将 OVX+PEMF 组大鼠每天持续 40min 暴露在频率 8Hz,磁场强度 3.8mT 的 PEMF 的环境下进行干预。SHAM 组和 OVX 组大鼠同样放置 PEMF 上,但不打开电源。分别于干预后第 8 周和第 16 周,将每组中一半的老鼠安乐死,无菌下取骨组织待测。

1.3.2 检测指标:骨矿物质密度测定:取各组大鼠左侧股骨,标记后储存在-80℃的环境中待测。使用双能X射线吸收骨密度仪(GE Lunar Prodigy,美国)测量每个股骨骨密度(bone mineral density, BMD),采用骨密度仪推荐的小动物分析方案进行扫描。

RT-PCR测定基因表达:收集大鼠髂骨组织,液氮冻存,充分研磨后使用 Trizol 试剂抽提总 RNA。使用 RevertAid 第一链 cDNA 合成试剂盒,在 20 μ l 反应里,从 2 μ g 总 RNA 中合成第一链 cDNA,每份样本

一式 3 份进行分析。根据说明书,使用 The light cycler-fast start DNA master SYBR green。实时 PCR 定量测定在实时 PCR 循环仪(ABI7500,美国)中进行。制定方案:预变性,95℃,10min;变性,95℃,20s;退火,60℃,20s;延伸,20s,72℃,共 40 个循环。内参基因 GAPDHmRNA 作为参照标准。

RANK, NFAT2, V-ATP 酶和 GAPDH 的 PCR 引物的具体序列列于表 1。

1.4 统计学分析

表 1 PCR 引物序列

基因	5'—3'	引物序列	产物大小(bp)	GenBank Accession 编号
rRANK	Forward	TCAGCATTTACTACAGGAAGGGAG	209	NM_001271235.1
	Reverse	AGCACAGTCTTCTGGAACCATCT		
rNFAT2	Forward	GGAGGGAAGAAGATGGTGTGT	182	NM_001244933.1
	Reverse	CTGGTTATTCTCTGTTGCGG		
rV-ATP	Forward	CACAACAGACAGATTACCTCCTA	180	NM_057213.2
	Reverse	GGCTTCTTCTCCACCCACAG		
GAPDH	Forward	AGTGCCAGCCTCGTCTCATAG	192	NM_001244933.1
	Reverse	CGTTGAACTTGCCGTGGGTAG		

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析相关基因表达的数据, $\Delta\Delta Ct = (\text{处理组 Ct 目的基因} - \text{Ct 内参基因}) - (\text{对照组 Ct 目的基因} - \text{Ct 内参基因})^{[7]}$ 。所有数据采用平均值 $\pm$ 标准差表示,各组间比较采用单向方差分析,方差不齐采用非参数检验。借助 SPSS 18.0 软件进行处理分析, $P < 0.05$ 具有显著性意义。

2 结果

2.1 骨密度测定

使用双能 X 线吸收测量法测量左股骨的 BMD (表 2),第 8 周和第 16 周,SHAM 组与 OVX 组相比,左侧股骨部位的 BMD 分别降低 6.62% ($P < 0.05$) 和 31.79% ($P < 0.001$)。干预 8 周后,OVX+PEMF 组与 OVX 组相比, $P > 0.05$,无显著性意义。干预 16 周后,OVX+PEMF 组与 OVX 组相比, $P < 0.05$ 。

2.2 各组 RANK、NFAT2、V-ATP mRNA 表达的检测

实时定量荧光 PCR 用于测量 mRNA 水平(图 1),SHAM 组与 OVX 组比较,8 周时 RANK 表达无

差异 ($P > 0.05$),而 SHAM 组 NFAT2 与 V-ATP 表达均低于 OVX 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);16 周时 RANK、NFAT2、V-ATP 在 OVX 组表达升高(均 $P < 0.01$)。SHAM 组与 OVX+PEMF 组比较,8 周时两组 RANK、NFAT2、V-ATP 表达均无差异 ($P > 0.05$);16 周时 OVX+PEMF 组 RANK 和 NFAT2 表达均高于 SHAM 组(均 $P < 0.01$),而两组 V-ATP 表达无差异 ($P > 0.05$)。OVX 组与 OVX+PEMF 组相比,8 周时两组 RANK 和 V-ATP 表达均无差异 ($P > 0.05$),而 OVX+PEMF 组 NFAT2 表达低于 OVX 组 ($P < 0.05$);第 16 周时两组 RANK 表达无差异 ($P > 0.05$),NFAT2 和 V-ATP 在 OVX+PEMF 组的表达均下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

3 讨论

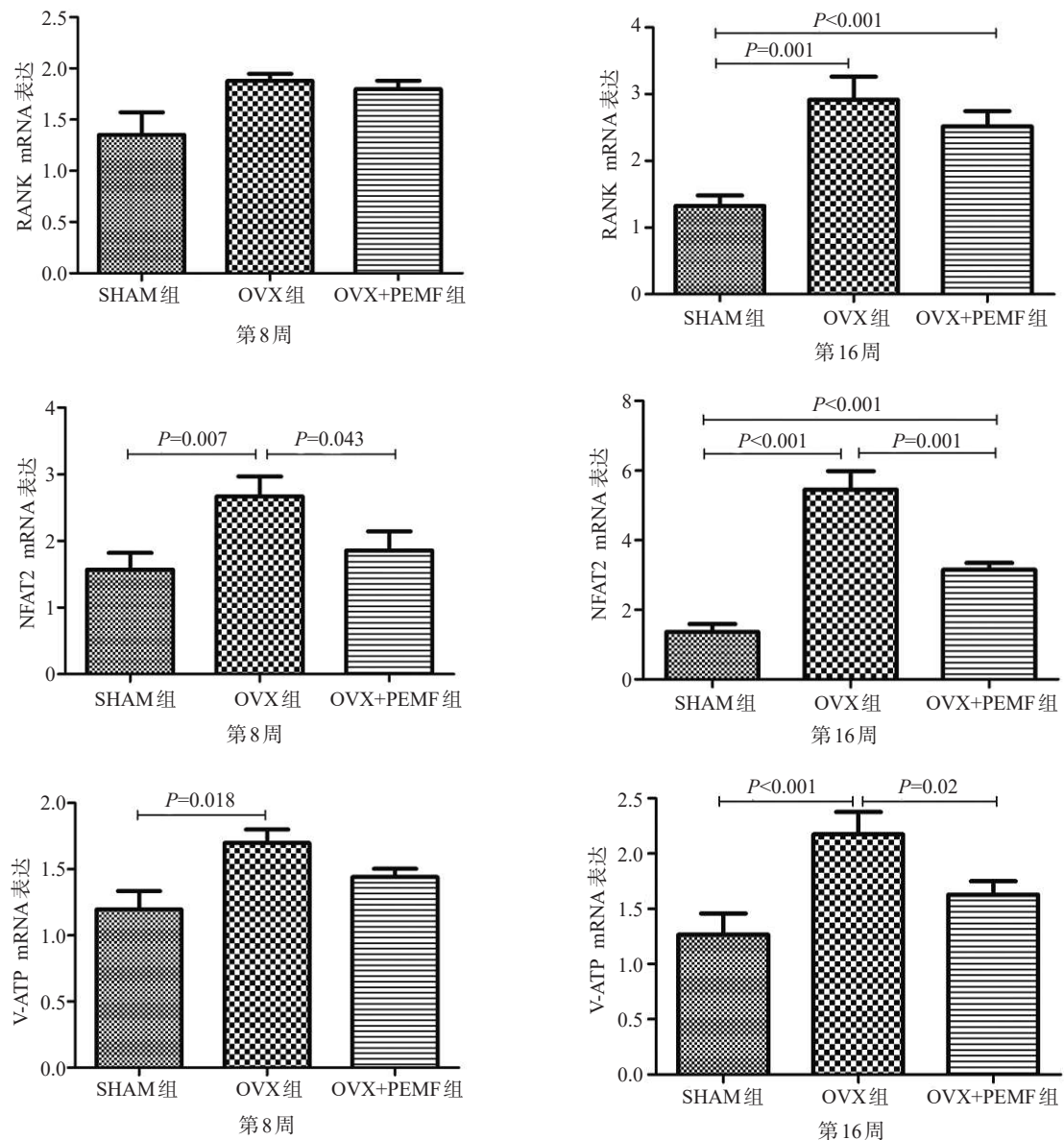
PEMF 是一种在临床中有效治疗 OP 的物理因子方法。已有荟萃分析提示,PEMF 可缓解绝经后 OP 患者的疼痛且安全性高^[8]。基础实验研究提示,PEMF 可促进成骨细胞活性和矿化成熟^[9],也可以抑制 OC 的数量和分化^[10-11]。Barnaba SA 等^[12]研究认为,PEMF 在短时间暴露只对 OC 表型起作用。我们前期研究发现 PEMF (干预参数:频率 8Hz,磁场强度 3.8mT,干预 40min)对体外培养 OC 中 RANK 和

表 2 左股骨 BMD 值测量结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$, g/cm²)

组别	SHAM 组	OVX 组	OVX+PEMF 组
8 周	0.166 $\pm$ 0.013 ^①	0.155 $\pm$ 0.003	0.158 $\pm$ 0.005
16 周	0.162 $\pm$ 0.017 ^②	0.111 $\pm$ 0.024	0.131 $\pm$ 0.009 ^①

①与 OVX 组比较 $P < 0.05$; ②与 OVX 组比较 $P < 0.001$ 。

图1 各组RANK、NFAT2、V-ATP mRNA在第8周和第16周的表达



NFAT2的表达起抑制作用^[13]。这些研究表明,PEMF可影响OC的活化和成熟,并通过各种信号通路抑制OC的骨吸收作用。本研究通过摘除卵巢构建OVX动物模型。与SHAM组比较,OVX组BMD在第8周即下降,随着卵巢切除时间延长,第16周降低更为显著,有显著性意义,提示造模成功。最新研究表明,PEMF可改善OVX大鼠腰椎BMD,以及显微结构和强度^[14]。本实验采用与我们前期体外试验同样的干预参数,从体内实验研究PEMF对OC分化成熟过程中的部分关键基因RANK、NFAT2及V-ATP影响。

骨髓基质干细胞表面的RANK与OB分泌的RANKL组合,促进骨髓基质干细胞向OC分化成熟,形成骨吸收^[14]。NFAT2是OC发生的关键的终末分化因子,主要通过RANKL-RANK结合后激活 Ca^{2+} 振荡调节CN来维持活性^[15]。当NFAT2被 Ca^{2+} 磷酸化后,可以进入细胞核并与转录因子AP-1配合活化基因表达^[16]。已有研究提示PEMF可以调节细胞内膜的 Ca^{2+} 通道,加速钙在骨组织中的沉积,说明PEMF促进骨形成的效应与早期增强细胞内 Ca^{2+} 浓度有关^[17]。而本研究中PEMF对骨质疏松大鼠骨组

组织中RANK的抑制作用并不明显,说明RANK并非 Ca^{2+} /CN/NFAT2信号通路的唯一上游基因,NFAT2及其他炎症因子也可能通过其他途径得到抑制^[18]。然而,PEMF可降低NFAT2的表达,对这与体外实验结果一致^[13],说明PEMF可能通过 Ca^{2+} /CN/NFAT2信号通路抑制OC骨吸收。

V-ATP酶是与骨吸收密切相关的,对骨吸收过程中的OC进行可视化免疫染色得知V-ATP酶位于褶皱缘上。在质子跨膜过程中将 H^+ 转运到吸收微环境中,再通过能量非依赖性的 HCO^+ 和 Cl^- 交换机制维持电离平衡,促使OC分泌HCl使吸收区域微环境内pH值达到4.5左右。在此微酸性环境中,一些蛋白水解酶被激活,例如组织蛋白酶和基质金属蛋白酶9等,导致裸露的胶原蛋白基质被分解,从而形成骨吸收^[19-20]。因此,V-ATP的功能障碍会导致破骨细胞的骨吸收过程受阻,抑制V-ATP的活性变成了抗骨质疏松治疗的靶点。我们在体内试验中发现PEMF也可降低V-ATP的表达,而且随着干预时间的延长,抑制作用逐渐加强,提示PEMF可能通过降低V-ATP的表达抑制OC活性,从而延缓OVX大鼠的骨丢失。

通过实验,我们验证了PEMF抗骨质疏松的部分生物学机制,但PEMF是否通过经典的 Ca^{2+} /CN/NFAT2信号通路抑制OC的活性,还是通过其他信号通路间接抑制NFAT2和V-ATP,两者之间是否存在关联,需要进一步通过的体内外实验得以验证,以明确PEMF抑制骨吸收的具体作用机制。

参考文献

- [1] Liu W,Zhang X.Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review)[J].Mol Med Rep,2015,11(5):3212—3218.
- [2] Zhang Y, Jiang P, Li W, et al. Calcineurin/NFAT signaling pathway mediates titanium particle induced inflammation and osteoclast formation by inhibiting RANKL and M-CSF in vitro[J].Mol Med Rep, 2017, 16(6):8223—8230.
- [3] Kajiya H. Calcium signaling in osteoclast differentiation and bone resorption[J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 740:917—932.
- [4] Qin A, Cheng TS, Pavlos NJ, et al. V-ATPases in osteoclasts: structure, function and potential inhibitors of bone resorption[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44:1422—1435.
- [5] 姜俊良,梁邱,杨浩伦,等.低频脉冲电磁场治疗绝经后骨质疏松症的临床疗效观察[J].中国康复医学杂志,2017,32(2):192—194.
- [6] He Z, Selvamurugan N, Warshaw J, et al. Pulsed electromagnetic fields inhibit human osteoclast formation and gene expression via osteoblasts[J]. Bone, 2018, 106:194—203.
- [7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method[J]. J Methods, 2001, 25:402—408.
- [8] 徐换,郝赤子,郑俊,等.脉冲电磁场治疗绝经后骨质疏松症的Meta分析[J].中国康复,2017,32(3):230—234.
- [9] 方清清,李志忠,周建,等.信号分子p38参与低频脉冲电磁场促进成骨细胞矿化成熟的实验研究[J].中国修复重建外科杂志,2016,30(10):1238—1243.
- [10] Zhang J, Xu H, Han Z, et al. Pulsed electromagnetic field inhibits RANKL-dependent osteoclastic differentiation in RAW264.7 cells through the Ca^{2+} -calcineurin-NFAT2 signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 482(2):289—295.
- [11] Pagani S, Veronesi F, Aldini NN, et al. Complex regional pain syndrome Type I, a debilitating and poorly understood syndrome. possible role for pulsed electromagnetic fields: A narrative review[J].Pain Physician,2017,20(6):E807—E822.
- [12] Barnaba SA, Ruzzini L, Martino AD, et al. Clinical significance of different effects of static and pulsed electromagnetic fields on human osteoclast cultures[J]. Rheumatol Int, 2012, 32:1025—1031.
- [13] He J, Zhang Y, Chen J, et al. Effects of pulsed electromagnetic fields on the expression of NFAT2 and CAII in mouse osteoclast-like cells[J]. Aging Clin Exp Res, 2015, 27(1):13—19.
- [14] Lei T, Liang Z, Li F, et al.Pulsed electromagnetic fields (PEMF) attenuate changes in vertebral bone mass, architecture and strength in ovariectomized mice[J].Bone, 2017, 8, 108:10—19.
- [15] Niu C, Xiao F, Yuan K, et al. Nardosinone suppresses rankl-induced osteoclastogenesis and attenuates lipopolysaccharide-induced alveolar bone resorption[J]. Front Pharmacol, 2017, 12, 8:626.
- [16] Di Nisio C, Zizzari VL, Zara S, et al. RANK/RANKL/OPG signaling pathways in necrotic jaw bone from bisphosphonate-treated subjects[J]. Eur J Histochem, 2015, 59(1):2455.
- [17] Zawawi MS, Dharmapatni AA, Cantley MD, et al. Regulation of ITAM adaptor molecules and their receptors by inhibition of calcineurin-NFAT signalling during late stage osteoclast differentiation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications 2012;427:404—409.
- [18] Petecchia L, Sbrana F, Utzeri R, et al. Electro-magnetic field promotes osteogenic differentiation of BM-hMSCs through a selective action on Ca^{2+} -related mechanisms[J]. Sci Rep, 2015,5:13856.
- [19] Li M, Wang X, Bian Z, et al. Peptide 11R-VIVIT stimulates osteoblastogenesis through regulating the expression of nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1[J].Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2017, 29, 63(4):46—52.
- [20] Cotter K, Stransky L, McGuire C, et al. Recent insights into the structure, regulation, and function of the V-ATPases[J]. Trends Biochem Sci, 2015, 40(10):611—622.
- [21] Qin A, Cheng TS, Lin Z, et al. Versatile roles of V-ATPases accessory subunit Ac45 in osteoclast formation and function[J]. PLoS One, 2011, 6:e27155.