

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21720090153586

UDC_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

环氧二烯 Mycoepoxydiene 和雌二醇抑制破骨细胞
分化和骨质疏松症发生的机理研究

The molecular mechanism of Mycoepoxydiene and 17- β -estradiol in
suppressing osteoclast differentiation and osteoclastogenesis

朱 敬 伟

指导教师姓名: 俞春东教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2012年05月

论文答辩时间: 2012年06月

学位授予日期: 2012年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012年06月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

摘 要	1
ABSTRACT	2
第一章 前言	3
1.1 骨质疏松症	3
1.1.1 骨质疏松症背景知识	3
1.1.2 骨质疏松症研究的实验动物模型	3
1.1.2.1 维甲酸模型	3
1.1.2.2 可的松模型	4
1.1.2.3 卵巢切除模型	4
1.2 破骨细胞体外诱导分化系统和分子机制	4
1.2.1 破骨细胞形成过程	5
1.2.2 破骨细胞体外诱导的两个关键细胞因子	6
1.2.3 肿瘤坏死因子受体偶联蛋白 (TNF receptor-associated factor , TRAF6)	6
1.2.4 NF- κ B: 多分子机制调节的关键信号分子复合体	7
1.2.5 丝裂原活化蛋白激酶 Mitogen-activated protein kinases(MAPKs)	8
1.2.5.1 细胞外信号调节蛋白激酶 ERK1/2	9
1.2.5.2 c-jun 氨基末端激酶/应激激活的蛋白激酶 JNK1/SAPK	9
1.2.5.3 p38	10
1.2.6 转录激活蛋白 1 (Activator protein 1)	11
1.2.7 Nuclear factor of activated T cells (NTATc1): 破骨细胞分化关键整合因子	12
1.3 环氧二烯 MYCOEPOXYDIENE	14
1.4 类固醇激素受体辅激活子家族 (STEROID RECEPTOR COACTIVATOR, SRC)	15
1.4.1 类固醇激素	15
1.4.2 核受体	16

1.4.2.1 核受体分类	17
1.4.2.2 核受体结构	17
1.4.2.3 核受体辅调节子	18
1.4.3 SRC 家族介绍	20
1.4.3.1 SRC 家族的基因定位和结构	20
1.4.3.2 SRC-3 家族的生物学功能	21
1.5 本文立题背景、内容和意义	23
第二章 材料与方法	25
2.1 材料	25
2.1.1 细胞、小鼠和菌株	25
2.1.1.1 细胞	25
2.1.1.2 小鼠	25
2.1.1.3 菌株	25
2.1.2 主要试剂	25
2.1.3 主要仪器	28
2.2 方法	29
2.2.1 DNA 相关实验及方法	29
2.2.1.1 大肠杆菌感受态细胞的 DNA 转化	29
2.2.1.2 质粒 DNA 的提取	30
2.2.2 细胞相关实验及方法	31
2.2.2.1 小鼠原代细胞的提取及培养	31
2.2.2.2 细胞系培养	32
2.2.2.3 用 INTERFERin™ 做 siRNA 转染	33
2.2.2.4 细胞瞬时转染	33
2.2.2.5 细胞毒性实验 (MTT 法)	34
2.2.2.6 抗酒石酸性磷酸酶染色 (TRAP 染色)	35
2.2.2.7 细胞核抽提	36

2.2.2.8 凝胶阻抑实验 (EMSA)	36
2.2.2.9 荧光共聚焦实验	37
2.2.3 RNA 相关实验及方法	38
2.2.3.1 RNA 的提取	38
2.2.3.2 反转录合成 cDNA	39
2.2.4 蛋白质相关实验及方法	40
2.2.4.1 蛋白质样品制备	40
2.2.4.2 蛋白质浓度测定 (BCA 法)	40
2.2.4.3 Bradford 法测定蛋白浓度	41
2.2.4.4 蛋白质的 SDS-PAGE 电泳及 Western blotting 分析	41
2.2.5 组织切片及苏木精-伊红 (H&E) 染色	42
2.2.5.1 组织包埋	42
2.2.5.2 组织切片	42
2.2.5.3 切片 H&E 染色	43
2.2.6 Methylmethacrylate (MMA) 包埋和 Von kossa/van gieson 染色	43
2.2.6.1 小鼠腿骨分离和固定	43
2.2.6.2 脱水	43
2.2.6.3 MMA 包埋组织	44
2.2.6.4 切片	45
2.2.6.5 Von kossa/van gieson staining	45
2.2.7 动物相关实验及方法	46
2.2.7.1 小鼠卵巢切除手术	46
2.2.7.2 雌激素缓释剂的制备	47
2.2.7.3 MED 治疗骨质疏松小鼠实验模型	47
2.2.7.4 雌激素治疗 SRC-3 野生型和敲除型骨质疏松小鼠	48
第三章 结果与讨论	49
3.1 环氧二烯 MED 在骨质疏松发生中的作用	49
3.1.1 MED 对 BMMs 和 RAW264.7 细胞均没有毒性作用	49

3.1.2 MED 强烈抑制破骨细胞分化	50
3.1.3 MED 在破骨细胞分化的早期 发挥其抑制作用	52
3.1.4 MED 抑制 NF- κ B 信号通路的激活	54
3.1.5 MED 通过抑制 ERK 磷酸化来抑制破骨细胞的形成	55
3.1.6 MED 有效抑制 RANKL 诱导的 NF- κ B 转运入核	59
3.1.7 MED 明显抑制 RANKL 诱导的 NF- κ B 活性	59
3.1.8 MED 有效抑制破骨细胞分化关键整合因子 NFATc1 的蛋白表达	61
3.1.9 MED 明显抑制破骨细胞特征基因的表达	62
3.1.10 MED 通过抑制 TAK1 的活化影响下游信号通路	65
3.1.11 MED 有效抑制卵巢切除小鼠后骨质疏松症的发生	65
3.2 SRC-3 在介导雌激素抑制破骨细胞生成和骨质疏松发病中的作用	69
3.2.1. 体外诱导破骨细胞生成	69
3.2.1.1 RAW264.7 细胞诱导形成破骨细胞	69
3.2.1.2 SRC-3 基因沉默后对 骨髓来源性巨噬细胞形成破骨细胞的影响	70
3.2.2 雌二醇对 SRC-3 野生型和敲除型小鼠骨质疏松症的影响	71
3.3 讨论与分析	72
参考文献:	75
图表索引	86
缩略语及中英文对照	87
致谢	90
在学期间发表的论文	92

CONTENTS

ABSTRACT(CHINESE)	1
Abstract(ENGLISH)	2
CHAPTER 1 INTRODUCTION	3
1.1 OSTEOPOROSIS	3
1.1.1 Background	3
1.1.2 Animal model of osteoporosis	3
1.1.2.1 Retinoic acid model	3
1.1.2.2 cortisone model	4
1.1.2.3 ovariectomy model	4
1.2 Molecular mechanism of osteoclast differentiation in vitro	4
1.2.1 Process of osteoclast formation	5
1.2.2 Two important factor in inducing osteoclast differentiation	6
1.2.3 TNF receptor-associated factor (TRAF6)	6
1.2.4 NF- κ B: vital regulator complex	7
1.2.5 Mitogen-activated protein kinases(MAPKs)	8
1.2.5.1 Extracellular regulated protein kinases(ERK1/2)	9
1.2.5.2 C-jun N-terminal kinase (JNK1/SAPK)	9
1.2.5.3 p38	10
1.2.6 Activator protein 1	11
1.2.7 Nuclear factor of activated T cells (NTATc1)	12
1.3 Mycoepoxydiene	14
1.4 Steroid receptor coactivator (SRC)	15
1.4.1 Steroid hormone	15
1.4.2 Nuclear receptor	16
1.4.2.1 Classification	17
1.4.2.2 Structure	17
1.4.2.3 Coregulator	18

1.4.3 SRC family	20
1.4.3.1 Location and structure of SRC gene	20
1.4.3.2 Biological function of SRC family	21
1.5 Background , content and significance of this thesis	23
CHAPTER 2 Materials and Methods	25
2.1 Materials	25
2.1.1 Cell, mouse and strain	25
2.1.1.1 Cell	25
2.1.1.2 Mouse	25
2.1.1.3 Strain	25
2.1.2 Major reagent	25
2.1.3 Major equipment	28
2.2 Methods	29
2.2.1 DNA related experiments and methods	29
2.2.1.1 TRANSFORMATION OF COMPONENT CELLS	29
2.2.1.2 Plasmid isolation	30
2.2.2 Cell work	31
2.2.2.1 Isolation and culture bone marrow cells	31
2.2.2.2 Cell line culture	32
2.2.2.3 siRNA transfection by INTERFERin™	33
2.2.2.4 Transient transfection	33
2.2.2.5 MTT	34
2.2.2.6 Tartrate Resistant Acid Phosphatase, TRAP staining	35
2.2.2.7 Nuclear extraction	36
2.2.2.8 EMSA	36
2.2.2.9 Immunofluorescent assay	37
2.2.3 RNA experiments	38
2.2.3.1 RNA isolation	38
2.2.3.2 Reverse transcription	39
2.2.4 Protein work	40
2.2.4.1 Preparation of protein samples	40

2.2.4.2 Measurement of protein concentration by BCA method	40
2.2.4.3 Measurement of protein concentration by Bradford method	41
2.2.4.4 SDS-PAGE and western blotting	41
2.2.5 Tissue section and H&E staining	42
2.2.5.1 Preparation of tissue samples	42
2.2.5.2 tissue section	42
2.2.5.3 H&E staining	43
2.2.6 Methylmethacrylate embed and Von kossa/van gieson staining	43
2.2.6.1 Preparation of bone samples	43
2.2.6.2 Dehydration	43
2.2.6.3 MMA embed	44
2.2.6.4 Bone tissue section	45
2.2.6.5 Von kossa/van gieson staining	45
2.2.7 Mice work	46
2.2.7.1 Ovariectomy surgery	46
2.2.7.2 Preparation of E2 pellet	47
2.2.7.3 MED treatment on ovariectomized mice	47
2.2.7.4 E2 treatment on ovariectomized SRC-3 WT and KO mice	48
CHAPTER 3 results and discussion	49
3.1 The role of MED in osteoclast formation and osteoclastogenesis	49
3.1.1 MED has no toxicity on BMMs and RAW264.7 cells	49
3.1.2 MED strongly inhibits osteoclast formation	50
3.1.3 MED effects on early stage of osteoclast differentiation	52
3.1.4 MED suppresses NF- κ B activation	54
3.1.5 MED represses ERK phosphorylation	55
3.1.6 MED effectively blocks RANKL induced NF- κ B translocation	59
3.1.7 MED significantly reduced RANKL induced NF- κ B activity	59
3.1.8 MED strongly attenuates the expression of NFATc1	61
3.1.9 MED significantly reduced osteoclast marker genes mRNA expression	62
3.1.10 MED inhibits NF- κ B and ERK signaling pathways through repressing TAK1 activation	65
3.1.11 MED effectively protects ovariectomized mice from bone loss	65

3.2 The role of SRC-3 in mediating estrogen effect in osteoclastogenesis69

 3.2.1. Induction of osteoclast formation in vitro69

 3.2.1.1 Osteoclast formation in RAW264.7 cells69

 3.2.1.2 Downregulation of SRC-3 effects osteoclast formation in BMMs70

 3.2.2 Effect of 17- β -estradiol in ovariectomized SRC-3 WT and KO mice71

3.3 Discussion72

REFERENCES75

LIST OF FIGURES86

ABBREVIATIONS87

ACKNOWLEDGEMENT90

PUBLICATIONS92

摘要

破骨细胞是骨髓来源性的多核细胞，它的功能是吸收陈旧骨，并在骨重建中发挥着重要的作用。破骨细胞的功能异常往往导致骨质疏松，类风湿性关节炎等疾病，目前治疗骨质疏松类疾病的靶点是破骨细胞。

一方面，环氧二烯（Mycoepoxydiene, MED）是一个以含有氧桥的八元环二烯为骨架的化合物，是红树林海洋真菌菜豆间坐壳菌（*Diaporthe* sp. HLY-1）的次级代谢产物。研究表明环氧二烯具有许多生物学功能，例如抗肿瘤活性，抑制炎症发生等，而骨质疏松症的发生与机体炎症有着密切的关系，但是该化合物在骨质疏松发生中的作用尚不清楚。在本文中，我们利用破骨细胞体外诱导系统和卵巢切除引发的骨质疏松症为模型。通过细胞水平和动物水平研究来揭示环氧二烯在骨质疏松发病中的作用及机理。通过小鼠骨髓来源性细胞实验，我们发现环氧二烯可以明显抑制破骨细胞形成，并且其作用时间是在破骨细胞分化的早期。细胞信号通路检测结果显示，环氧二烯通过抑制 NF- κ B 和 ERK 信号通路降低破骨细胞分化关键整合因子 NFATc1 的蛋白水平，从而抑制破骨细胞特征基因-抗酒石酸性磷酸酶，降钙素受体和组织蛋白酶 K 的表达水平。通过卵巢切除诱导的骨质疏松症实验动物模型，我们发现环氧二烯能明显抑制卵巢切除后小鼠松质骨的丢失，提高骨量，抑制骨质疏松症的发生。

综上所述，环氧二烯通过抑制破骨细胞发生中 NF- κ B 和 ERK 信号通路，下调破骨细胞关键整合因子 NFATc1，从而有效的抑制破骨细胞特征基因表达，进一步抑制骨质疏松症的发生。本研究为开发环氧二烯作为治疗骨质疏松症药物提供了一定的理论依据。

另一方面，利用类固醇激素受体辅激活子 3(SRC-3)野生型和敲除型的小鼠进行实验，发现 SRC-3 基因缺失对于雌二醇抑制破骨细胞形成有一定的影响，但是小鼠体内实验表明 SRC-3 对于雌二醇治疗小鼠骨质疏松症是非必需的。

关键词：环氧二烯；SRC-3；破骨细胞

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库