

钙敏感受体促进小鼠长骨的生长及软骨矿化

刘欢,徐勇,舒磊,曹国凡,苗登顺,任永信*

(南京医科大学第一附属医院骨科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨钙敏感受体(calcium sensing receptor, CaSR)对小鼠长骨及软骨矿化的直接作用。方法:利用骨移植的方法将出生后 3 d 同窝的野生型和 CaSR 基因敲除小鼠的股骨胫骨移植至同父母来源的 8 周龄的野生型小鼠背阔肌中。生长 4 周后,取出股骨和胫骨进行 X 线和组织学分析。结果:CaSR 基因敲除小鼠骨骼生长严重阻滞,并且其生长板的软骨肥大细胞带显著宽于野生型小鼠的软骨肥大细胞带($P < 0.001$)。结论:CaSR 具有直接促进长骨生长的作用,并且能够促进肥大软骨细胞矿化和骨化。

[关键词] 钙敏感受体;骨移植;软骨细胞;软骨内成骨

[中图分类号] R336

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)09-1163-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140903

Calcium sensing receptor improves long bone formation and cartilage mineralization of mice

Liu Huan, Xu Yong, Shu Lei, Cao Guofan, Miao Dengshun, Ren Yongxin*

(Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the direct action of calcium sensing receptor (CaSR) on both long bone and cartilage mineralization of mice. **Methods:** The femur and tibia of both 3-day-old wild-type and CaSR gene knockout mice from the same brood were transplanted into the latissimus dorsi muscle of 8-week-old wild type mice with the same parents of the 3-day-old mice. After 4 weeks, the femur and tibia were analyzed with X-ray and histology methods. **Results:** CaSR knock-out mice exhibited growth retardation and the hypertrophic zone of cartilage was obviously wider than that of the wild-type mice ($P < 0.001$). **Conclusion:** CaSR have a direct promoting action on long bone growth, and can stimulate the mineralization and ossification of hypertrophic chondrocytes.

[Key words] calcium sensing receptor; bone transplantation; chondrocytes; endochondral ossification

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(09): 1163-1167]

长骨的生长是一个软骨内成骨的过程,在长骨的生长板,软骨的增殖、肥大以及基质的合成都导致新软骨的形成,同时在生长板的干骺端,新生的血管和骨细胞前体进入软骨肥大细胞带和矿化或非矿化的软骨基质区,促使软骨转变为成骨^[1-2]。长骨的纵向生长速度主要是由软骨的形成速度所决定的。而软骨的形成受多种内分泌和旁分泌因子的调节。有证据显示:在长骨的生长过程中,胞外钙在调节生长板的软骨细胞功能时起到重要作用^[3]。研究发

现,钙和维生素 D 不足会导致生长板的矿化受损^[4-5]。研究已经证实胞外钙发挥其生理学功能是通过激活其受体——钙敏感受体 (calcium sensing receptor, CaSR)来实现的^[6]。CaSR 是一个 G 蛋白偶联受体,表达于哺乳动物的大多数组织中,如甲状旁腺、骨骼、乳腺、肾脏等^[7]。也表达于长骨生长板的增殖带和肥大带^[8]。CaSR 基因敲除的小鼠显示生长延迟^[9],这说明 CaSR 具有促进骨骼生长的作用。然而这种基因敲除的小鼠表型复杂,包括甲状旁腺功能亢进、高钙血症、低磷血症,可能掩盖了 CaSR 对骨骼的直接作用^[10-11]。为了证实 CaSR 是否调节生长板的软骨形成以及促进长骨的生长。本研究采用骨骼移植的方法将出生后 3 d 同窝的野生型(WT)和 CaSR 基因

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81371970)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: renyongxin@aliyun.com

敲除(CaSR^{-/-})小鼠的股骨、胫骨移植至同父母来源的8周龄野生型(WT)小鼠的背阔肌中。移植骨生长4周后,取出股骨和胫骨进行X线和组织学分析。

1 材料和方法

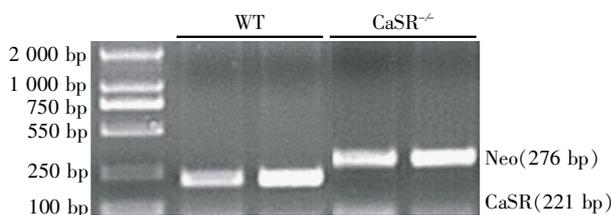
1.1 材料

选用 C57BL/6J 出生后 3 d 同窝的 WT 和 CaSR^{-/-}小鼠以及与该小鼠同父母来源的 8 周龄 WT 小鼠各 6 只(从加拿大 McGill 大学引进,饲养于南京医科大学动物中心),雌雄不限。

1.2 方法

1.2.1 动物基因型的鉴定

取出生当天的小鼠鼠尾用苯酚-氯仿-异戊醇的方法提 DNA。然后通过 PCR 进行基因型鉴定。CaSR 的正向引物序列为:5'-TCTGTTCTCTTTAG-GTCCTGAAACA-3', 反向引物为:5'-TCATTGAT-GAACAGTCTTTCTCCCT-3', Neo 的正向引物为:5'-TCTTGATTCCCACCTTTGTGGTTCTA-3', 反向引物序列同 CaSR 的反向引物序列。所有引物均由美国 Invitrogen 公司合成。Taq 酶(大连宝生物有限公司)。PCR 反应条件:94℃预变性 4 min, 94℃解链 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s。共进行 30 个循环。72℃延伸 10 min。使用 Bio-Rad Mycycler PCR 扩增仪。CaSR 的扩增产物为 221 bp, Neo 扩增产物为 276 bp。只有 CaSR 扩增条带的为野生型(WT), 只有 Neo 扩增条带的为纯合子(CaSR^{-/-}), 既有 CaSR 扩增条带, 又有 Neo 扩增条带的为杂合子。本试验中使用的是 WT 和 CaSR 纯合子(CaSR^{-/-})小鼠(图1)。



WT:野生型;CaSR^{-/-}:CaSR 敲除。

图1 小鼠基因型鉴定图例

Figure 1 Identification of genotype of mice

1.2.2 骨移植

取 C57BL/6J 来源的出生后 3 d 同窝的 WT 和 CaSR^{-/-}小鼠左侧的股骨和胫骨,移植至与该小鼠同父母来源的 WT 小鼠的背阔肌中。左侧背阔肌移植 WT 小鼠的股骨、胫骨,右侧移植 CaSR^{-/-}小鼠的股骨、胫骨。移植骨在背阔肌中生长 4 周。

1.2.3 取材

将 3 d 的 WT、CaSR^{-/-}小鼠左侧的股骨、胫骨和生长 4 周的移植骨取出,放在多聚甲醛-赖氨酸-过碘酸钠固定液中固定,常规脱钙,脱水,石蜡包埋,然后切片做组织学染色。

1.2.4 X 线摄影

未脱钙的 WT 和 CaSR^{-/-}小鼠的股骨、胫骨使用 Faxitron model 805 radiographic inspection system (Faxitron Contact 公司,德国)进行摄片(电压 22 kV,曝光时间 4 min)。底片使用 X-Omat TL film (Eastman Kodak 公司,美国),常规方法进行显影定影。使用 HP 扫描仪扫描分析。

1.2.5 HE 染色

石蜡切片常规脱腊水化,苏木素(Sigma 公司,美国)染色,1%盐酸酒精分色,流水冲洗返蓝,伊红(Sigma 公司,美国)复染,常规脱水透明,中性树脂胶封片。

1.3 统计学方法

所有染色均由 Leica 数码显微镜拍摄,并用 Northern Eclipse 图像分析软件进行定量分析。数据使用 SPSS15.0 软件进行组间单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

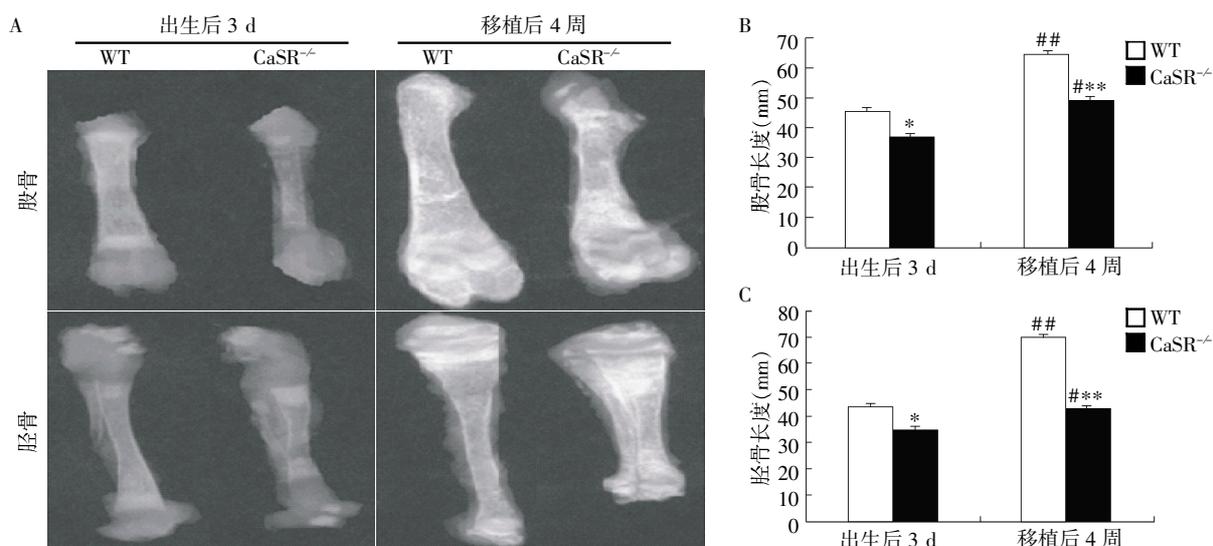
2 结果

2.1 CaSR 缺失对股骨、胫骨生长的影响

为了验证 CaSR 缺失是否会引起长骨长度的改变,通过 X 线检测了生后 3 d 以及骨移植 4 周后的 WT 和 CaSR^{-/-}小鼠的股骨和胫骨的长度。结果显示:出生后 3 d, CaSR^{-/-}小鼠的股骨、胫骨长度相对于 WT 小鼠明显缩短 ($P < 0.05$)。移植 4 周后,WT 和 CaSR^{-/-}小鼠的股骨、胫骨相对于出生后 3 d 时均显著增长 ($P < 0.001, P < 0.05$),但 WT 小鼠增长的幅度远远大于 CaSR^{-/-}小鼠增长的幅度(图 2)。这说明 CaSR 具有促进长骨纵向生长的直接作用。

2.2 CaSR 缺失对软骨生长的影响

为了研究 CaSR 缺失是否对软骨生长产生影响,通过石蜡切片 HE 染色对股骨生长板的长度、生长板的增殖带和肥大带进行观察。结果显示:无论是在出生后 3 d 还是移植后 4 周,WT 和 CaSR^{-/-}小鼠股骨生长板的长度两者之间没有明显差异,但是 4 周时股骨生长板相对于 3 d 时的生长板显著缩短 ($P < 0.05$)。这可能与 4 周时长骨的纵向生长已经减弱或停止,生长板在骨生长中的作用逐渐减弱有关。但从生长板肥大细胞带的长度可以看出:无论是 3 d 还是移植后 4 周, CaSR^{-/-}小鼠的肥大细胞带均显著



A: 出生后 3 d 和移植后 4 周 WT 和 CaSR^{-/-}小鼠的股骨、胫骨 X 线图; B: 出生后 3 d 和移植 4 周后 WT 与 CaSR^{-/-}小鼠的股骨长度统计图; C: 出生后 3 d 和移植 4 周后 WT 与 CaSR^{-/-}小鼠的胫骨长度统计图。与 WT 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ ($n = 6$); 与出生后 3 d 相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.001$ ($n = 6$)。

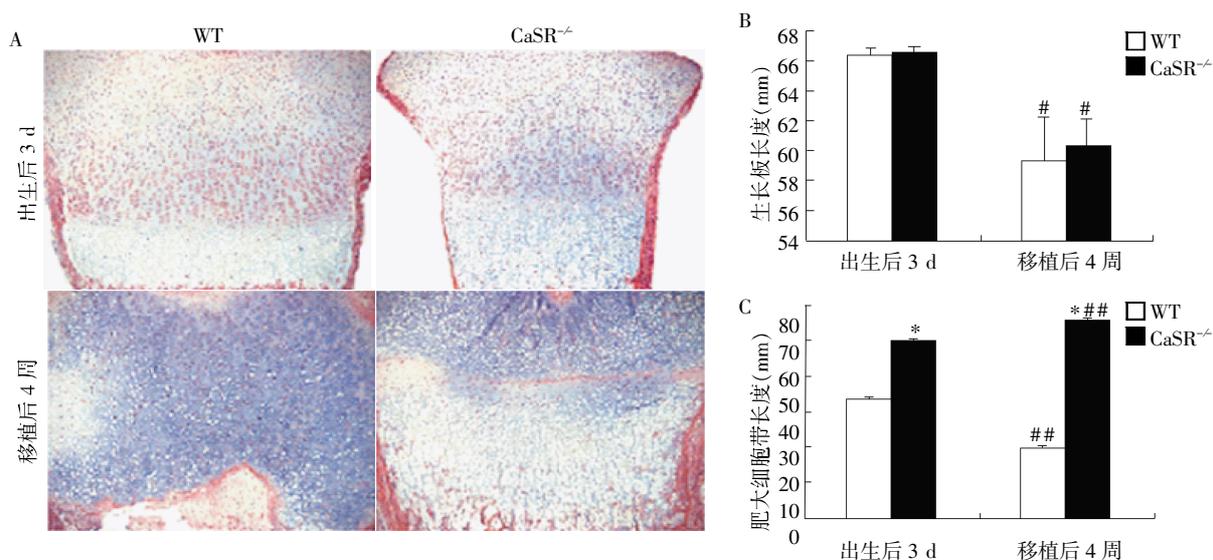
图 2 CaSR 缺失对股骨、胫骨生长的影响

Figure 2 Effects of CaSR ablation for femur and tibia growth

宽于 WT 小鼠 ($P < 0.001$)。移植 4 周后, WT 小鼠股骨肥大细胞带要显著小于出生后 3 d 时 WT 小鼠的肥大细胞带 ($P < 0.001$); 但是移植 4 周后, CaSR^{-/-}小鼠股骨肥大细胞带比出生后 3 d 时 CaSR^{-/-}小鼠的肥大细胞带显著增宽 ($P < 0.001$, 图 3)。

3 讨论

先前 Garner 等^[12]对 WT 和 CaSR^{-/-}小鼠的骨骼表型做了详细分析, 发现敲除甲状旁腺中的 CaSR 基因将导致甲状旁腺功能亢进、高钙血症、低磷血症



A: 出生后 3 d 和移植后 4 周 WT 和 CaSR^{-/-}小鼠生长板 HE 染色 ($\times 100$); B: 出生后 3 d 和移植 4 周后 WT 与 CaSR^{-/-}小鼠的生长板长度统计图; C: 出生后 3 d 和移植 4 周后 WT 与 CaSR^{-/-}小鼠的软骨肥大细胞带长度统计图。与 WT 相比, * $P < 0.001$ ($n = 6$); 与出生后 3 d 相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.001$ ($n = 6$)。

图 3 CaSR 缺失对软骨生长的影响

Figure 3 Effects of CaSR ablation for chondrocytes growth

以及骨骼中的 PTH 过量表达,而且 CaSR 基因敲除的小鼠显示出骨骼生长的延迟^[8],其软骨发育不全,增加矿化骨的形成和骨吸收,不能纠正 CaSR 缺失引起的骨骼表型异常^[13]。而且,这类小鼠最主要的骨骼异常就是佝偻病。这说明 CaSR 具有促进骨骼生长的作用。但它并不能反映 CaSR 对骨骼生长的直接作用。因为 CaSR 基因敲除小鼠其表型很复杂,包括:甲状旁腺功能亢进、高钙血症、低磷血症^[14]。这些原发或继发性的作用掩盖了 CaSR 对骨骼的直接作用^[15]。为了证实 CaSR 是否调节生长板的软骨形成以及促进长骨生长,本研究采用骨骼移植将出生后 3 d 同窝的 WT 和 CaSR^{-/-}敲除小鼠的股骨、胫骨移植至同父母来源的 8 周龄的 WT 小鼠背阔肌中。移植骨生长 4 周后,取出股骨和胫骨进行 X 线和组织学分析。在出生后 3 d,WT 小鼠的股骨、胫骨长度比 CaSR^{-/-}小鼠的股骨、胫骨长,这可能是因为 CaSR 缺失直接导致了长骨生长的延滞,也可能是由于甲状旁腺功能亢进使得甲状旁腺激素分泌过多从而抑制骨骼的生长。为此,本研究采用骨骼移植的方法给 CaSR^{-/-}小鼠骨骼的生长提供一个与 WT 小鼠骨骼生长相同的环境。移植 4 周后,虽然 WT 和 CaSR^{-/-}小鼠的长骨都有增长,但 WT 小鼠的增长幅度远远大于 CaSR^{-/-}小鼠。这说明 CaSR 的缺失可以直接抑制骨骼生长。

长骨的生长过程是一个软骨内成骨的过程。那么 CaSR 缺失抑制长骨的生长是否是通过影响软骨的形成来实现呢?为此研究了生长板的软骨细胞。HE 染色显示无论是出生后 3 d 还是移植后 4 周,生长板的总长度在两种基因型小鼠(WT 和 CaSR^{-/-})之间没有明显差异,但在移植后 4 周时,两种基因型小鼠的生长板长度要比生后 3 d 时短,这主要是与移植 4 周以后,移植骨的骨龄已趋成年化,长骨的纵向生长已停止或减弱,软骨细胞的功能减弱有关。虽然生长板的总长度在两种基因型小鼠之间没有明显差异,但软骨肥大细胞带却有明显差异,无论是在出生后 3 d,还是在移植后 4 周,CaSR^{-/-}小鼠的软骨肥大细胞带明显宽于 WT 小鼠;在 WT 小鼠中,移植后 4 周的肥大细胞带要小于出生后 3 d,而在 CaSR^{-/-}小鼠中,移植 4 周后的肥大细胞带要宽于出生后 3 d。CaSR 在生长板中的表达主要位于生长板的增殖带和肥大细胞带^[8]。所以 CaSR 缺失以后,软骨肥大细胞带增宽,骨长度缩短,这说明 CaSR 缺失使得软骨肥大细胞向成骨细胞矿化、骨化能力降低,软骨细胞聚集在肥大细胞带,从而使肥大细胞带增宽。

为了完全了解 CaSR 对骨和软骨功能的直接作

用,纠正甲旁亢是必须的。因为 CaSR^{-/-}新生小鼠致死率很高,从而掩盖了成年鼠中 CaSR 的骨骼作用。最近,有两个研究小组利用了双敲模型,Tu 等^[16]利用 CaSR 与 Gcm2 双基因敲除,Kos 等^[10]利用 CaSR 和 PTH 双基因敲除,成功纠正了甲旁亢以及与之伴随的高钙血症和低磷血症。在双敲模型中,小鼠骨骼没有明显异常,这说明:在骨骼分化和重建过程中,CaSR 并非是必不可少的^[17]。但这并不能否认 CaSR 对骨骼的作用。因为对于维持细胞的正常功能来说,钙的调节是最基本的,CaSR 的缺失可能导致其他代偿途径,其中一个代偿机制就是骨细胞中 CaSR 剪切变体的表达^[18-19]。这些受体存在于骨骼中,对胞外钙浓度的改变^[20]以及机械应力的改变^[21]具有反应。而且有人报道存在另一种不同于 CaSR 的 G 蛋白偶联受体^[22]。所有这些可能解释以上双敲小鼠骨骼表型没有改变的现象。

影响软骨内矿化和骨化的因素很多,包括多种激素和调节因子,通过影响软骨细胞分化速度、软骨细胞间信号转换、软骨细胞肥大以及软骨细胞所表达的特有基质类型等来协调软骨基质的钙化、矿化和骨化过程。这些激素和调节因子之间又存在相互作用,并通过复杂的反馈机制对靶器官产生作用。因此,本研究只揭示 CaSR 对软骨细胞的作用主要集中在软骨细胞的肥大向矿化的过程中,至于 CaSR 对软骨细胞矿化、骨化影响的具体机制还需进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Long F,Ornitz DM. Development of the endochondral skeleton [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol,2013,5(1):a008334
- [2] Ishijima M,Suzuki N,Hozumi K,et al. Perlecan modulates VEGF signaling and is essential for vascularization in endochondral bone formation[J]. Matrix Biol,2012,31(4):234-245
- [3] Ji J,Lu R,Zhou X,et al. 25-Dihydroxyvitamin D3 contributes to regulating mammary calcium transport and modulates neonatal skeletal growth and turnover cooperatively with calcium [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011,301(5):E889-E900
- [4] Amling M,Priemel M,Holzmann T,et al. Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis:formal histomorphometric and biomechanical analyses 1 [J]. Endocrinology, 1999,140(11):4982-4987
- [5] Richard C,Huo R,Samadfam R,et al. The calciumsensing

- receptor and 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase interact to modulate skeletal growth and bone turnover [J]. *J Bone Miner Res*,2010,25(7):1627-1636
- [6] Riccardi D,Brennan SC,Chang W. The extracellular calcium-sensing receptor,CaSR,in fetal development [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*,2013,27(3):443-453
- [8] Chang W,Tu C,Chen TH,et al. Expression and signal transduction of calcium-sensing receptors in cartilage and bone 1[J]. *Endocrinology*,1999,140(12):5883-5893
- [9] Chang W,Tu C,Chen TH,et al. The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) is a critical modulator of skeletal development[J]. *Sci Signal*,2008,1(35):231
- [10] Kos CH,Karaplis AC,Peng JB,et al. The calcium-sensing receptor is required for normal calcium homeostasis independent of parathyroid hormone [J]. *J Clin Invest*,2003,111(7):1021-1028
- [11] Cox LGE, Van Rietbergen B, Van Donkelaar CC, et al. The turnover of mineralized growth plate cartilage into bone may be regulated by osteocytes[J]. *J Biomech*,2011,44(9):1765-1770
- [12] Garner SC,Pi M,Tu Q,et al. Rickets in cation-sensing receptor-deficient mice:an unexpected skeletal phenotype [J]. *Endocrinology*,2001,142(9):3996-4005
- [13] Xue Y,Xiao Y,Liu J,et al. The calcium-sensing receptor complements parathyroid hormone-induced bone turnover in discrete skeletal compartments in mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*,2012,302(7):E841
- [14] Sun W,Sun W,Liu J,et al. Alterations in phosphorus, calcium and PTHrP contribute to defects in dental and dental alveolar bone formation in calcium-sensing receptor-deficient mice [J]. *Development*,2010,137(6):985-992
- [15] Chang W,Dvorak M,Shoback D. Assessing constitutive activity of extracellular calcium-sensing receptors *in vitro* and in bone[J]. *Methods Enzymol*,2010,484(2):253
- [16] Tu Q,Pi M,Karsenty G,et al. Rescue of the skeletal phenotype in CasR-deficient mice by transfer onto the Gcm2 null background [J]. *J Clin Invest*,2003,111(7):1029-1037
- [17] Marcucci G,Masi L,Cavalli L,et al. Is calcium signaling relevant for long bone growth? [J]. *Bone*,2013,57(1):105-110
- [18] Rodriguez L,Tu C,Cheng Z,et al. Expression and functional assessment of an alternatively spliced extracellular Ca²⁺-sensing receptor in growth plate chondrocytes [J]. *Endocrinology*,2005,146(12):5294-5303
- [19] Oda Y,Tu C L,Pillai S,et al. The calcium sensing receptor and its alternatively spliced form in keratinocyte differentiation[J]. *J Biol Chem*,1998,273(36):23344-23352
- [20] Dvorak-Ewell MM,Chen TH,Liang N,et al. Osteoblast extracellular Ca²⁺-sensing receptor regulates bone development,mineralization,and turnover [J]. *J Bone Miner Res*,2011,26(12):2935-2947
- [21] Skerry TM. Identification of novel signaling pathways during functional adaptation of the skeleton to mechanical loading;the role of glutamate as a paracrine signaling agent in the skeleton[J]. *J Bone Miner Metab*,1999,17(1):66-70
- [22] Pi M,Faber P,Ekema G,et al. Identification of a novel extracellular cation-sensing G-protein-coupled receptor [J]. *J Bio Chem*,2005,280(48):40201-40209

[收稿日期] 2014-04-09