

RANKL 诱导小鼠单核细胞 RAW264.7 分化成成熟破骨细胞

肖新华 周后德 王运林 张红 袁凌青 胡平安 杨雅
何玉玲 隋国良 翟木绪 王敏 廖二元

摘要: 目的 观察小鼠的单核/巨噬细胞 RAW264.7 的一般生物学特征及在 RANKL 诱导下形成成熟破骨细胞的特征。方法 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞 6d 后, 用抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色法观察 TRAP 阳性多核细胞, 吖啶橙染色激光共聚焦显微镜 (LCSM) 观察多核细胞形态; 诱导 RAW264.7 细胞 9d 后, RT-PCR 检测 RAW264.7 细胞的破骨细胞表型和功能基因表达及其 RANKL 诱导后变化; 诱导 RAW264.7 细胞 12d 后, 钙磷覆盖的破骨细胞活性分析板观察破骨细胞的骨吸收功能。结果 RAW264.7 细胞 TRAP 染色阴性, 单核或 2 个核, 能表达破骨细胞表型和功能基因, 无骨吸收功能。RANKL 可诱导 RAW264.7 细胞形成 TRAP 阳性成熟的多核破骨细胞, 上调 CathepsinK、CA II、integrin β 3 等基因 mRNA 的表达。结论 RAW264.7 具有破骨细胞特征性基因表达谱, 是一种较好的破骨前体细胞模型。RANKL 可诱导 RAW264.7 细胞形成成熟破骨细胞。

关键词: RAW264.7; 破骨细胞; 抗酒石酸酸性磷酸酶; RANKL

Osteoclastogenesis in RAW264.7 cells induced by RANKL XIAO Xinhua, ZHOU Houde, WANG Yunlin, et al. Institute of Endocrinology & Metabolism, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China

Abstract; Objective To observe the biologic characteristics of RAW264.7 cell, monocyte/macrophage cell originated from mouse, and to study the characteristics of mature osteoclast induced by RANKL from RAW264.7. **Methods** RAW264.7 cells were treated with or without RANKL for 6 days, and the morphological change was observed after TRAP staining and by LCSM. Osteoclast phenotypic and functional genes were detected with semiquantitative RT-PCR when RAW264.7 cells were induced for 9 days. Osteoclastic absorption functions were evaluated by bone resorption pit formation on osteoclast activity analysis platelet when RAW264.7 cells were induced for 12 days. **Results** RAW264.7 cells show TRAP-negative with monocyte or 2 nucleus, expressing osteoclast phenotypic and functional genes without capability of absorbing bone tissue. RAW264.7 cells could be induced to mature multiple nucleus osteoclasts, The expression of cathepsin K, CAII, integrin β 3 mRNA could be up-regulated by RANKL. **Conclusions** RAW264.7 cell could be used as a preferable preosteoclast model in respect of its osteoclast characteristic gene expression profile. RANKL could induce RAW264.7 cell to mature osteoclast.

Key words: RAW264.7; Osteoclast; Tartrate-resistant acid phosphatase; RANKL

破骨细胞的骨吸收与成骨细胞的骨形成之间的平

衡是维持正常骨重建基础。破骨细胞的活性改变是导致各种代谢性骨病的主要原因, 也是研究的热点和重点。但破骨细胞的分离和纯化问题困扰人们的研究。通过 RANKL 诱导破骨前身细胞是获得成熟破骨细胞的一种较好方法。本研究在观察小鼠单核/巨噬细胞 RAW264.7 的一般生物学行为的基础上,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30400218)

作者单位: 410011 长沙, 中南大学湘雅二医院代谢内分泌研究所 (肖新华、周后德、张红、袁凌青、胡平安、杨雅、何玉玲、隋国良、翟木绪、王敏、廖二元); 华中科技大学同济医院综合科 (王运林)

通讯作者: 廖二元, Email: eyliao@21cn.com

用 RANKL 诱导其形成成熟破骨细胞的可能性。

1 材料和方法

1.1 试剂

无酚红的 DMEM 培养基、TRAP 染色试剂盒和胎牛血清 (FBS) 购自 Sigma 公司, 小鼠重组 sRANKL 购自 Peprotech 公司, 逆转录试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

小鼠的单核/巨噬细胞系 RAW264.7 (ATCC 号: TIB-71) 用含 10% FBS 的无酚红 DMEM 培养液于 37℃, 5% CO₂ 培养, 其中含 50U/ml 青霉素和 50 μg/ml 链霉素。根据不同的实验目的接种于不同规格培养板上, 培养液每 3d 换一次。

1.2.2 RAW264.7 的一般生物学特征

RAW264.7 细胞以 1×10⁴/孔接种于 6 和 14 孔板, 连续培养 7 d, 用倒置相差显微镜观察细胞的形态特征。细胞计数, 观察细胞生长曲线。

1.2.3 破骨细胞形态观察

RAW 264.7 细胞以 1×10⁴/孔接种于 6 孔板, 培养过夜后换用 50 μg/ml, RANKL 干预, 细胞每 3 d

换液 1 次, 第 6 天 TRAP 染色 (sigma, 387-A), 细胞用柠檬酸盐/丙酮溶液固定 30 s, 在以萘酚 AS-BI 磷酸盐作为底物的孵育液中 37℃ 孵育 1h, 蒸馏水洗 3 次, 苏木素复染 2 min, 干燥后二甲苯透明, DPX 封片后光镜观察 TRAP 阳性多核破骨细胞 (≥3 个核)。由于荧光染料吖啶橙可与细胞核内 DNA 结合, 故可用吖啶橙染色观察 RAW264.7 细胞及诱导后的多核破骨细胞形态。相同方法培养的 RAW264.7 细胞吖啶橙染色后, 激光共聚焦显微镜 (LSCM, BioRad 公司) 下观察多核破骨细胞的形态。

1.2.4 骨吸收陷窝形成

RAW 264.7 细胞以 1×10⁴/孔接种于钙磷覆盖的破骨细胞活性分析板 (OAAS) (美国 OCT 公司), 50 μg/ml 的 RANKL 干预培养 12 d 后, 弃上清, PBS 洗 2 遍, 5% 次氯酸钠孵育 5 min, 蒸馏水洗 2 次, 凉干后显微镜观察吸收陷窝。

1.2.5 RT-PCR

分别用 10、30、50 μg/ml 的 RANKL 干预 RAW264.7 细胞培养 9 d, 用 TRIZOL 抽提总 RNA, 用 RT-PCR 法检测 RANK、TRAP、MMP-9、Cathepsin K 等基因的 mRNA 表达。以 β actin 基因作为对照引物序列见表 1, PCR 产物用 1.2% 琼脂糖电泳后拍照。

表 1 PCR 引物及退火温度

基因	正向引物	正引物	退火温度 (°C)
TRAP	5-acacagtgatgctgtgtggcaactc-3	5-ccagaggcttcacatatatgatgg-3	57
Cathepsin k	5-ctgaagatgcttcccatatgtggg-3	5-gcaggcgtttgttatttccagagc-3	56
RANK	5-acctccagtcagcaagaagt-3	5-tcacagccctcagaatccac-3	57
MMP-9	5-cgagtgagcgcacacctagttgg-3	5-caggcttagagccagaccatacag-3	64
β-actin	5-gaagagctatgagctgcctg-3	5-cacagagtacttgcgctcag-3	57
CA II	5-cttcaggacaatgcagtcg-3	5-atccaggtcacattccagc-3	55
TRAF6	5-agccccagaaagccagaagaa-3	5-cccttatggatttgatgatg-3	53
Integrin α v	5-gccagccattgagtttgatt-3	5-gtaccagaccaccagagaag-3	55
Integrin β3	5-ttaccctgtggacatctacta-3	5-agtcttccatccagggaata-3	53

1.2.6 统计学方法

数据结果采用 SPSS 11.0 软件, 组间比较用方差分析。

2 结果

2.1 RAW264.7 细胞的一般生物学特征

RAW264.7 细胞贴壁快, 形态以类圆形和不规则为主, 一般 1~2 个核, 极少数有 3 个核, 胞浆伸展时胞体较大。细胞贴壁紧, 胰酶-EDTA 难以消化, 需要多次消化吹打, 也可采用细胞刮法, 两种方法消化的

细胞生长曲线基本一致 (图 1)。

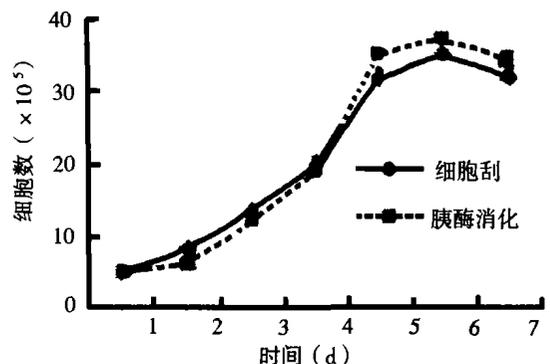


图 1 RAW264.7 细胞生长曲线

2.2 抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色观察

50 $\mu\text{g/ml}$ 的 RANKL 干预 KAW264.7 细胞, 2d 偶见 TRAP 阳性细胞; 4d TRAP 阳性多核细胞明显增多, 镜下胞浆呈玫瑰红色, 细胞核因苏木素复染而呈蓝色 (图 2)。

2.3 激光共聚焦显微镜 (LSCM) 观察多核细胞

50 $\mu\text{g/ml}$ 的 RANKL 干预 RAW264.7 细胞 6 d 后, 取出玻片, 吖啶橙荧光染料染色 2~3min, LSCM 观察多核破骨样细胞 (图 3)。

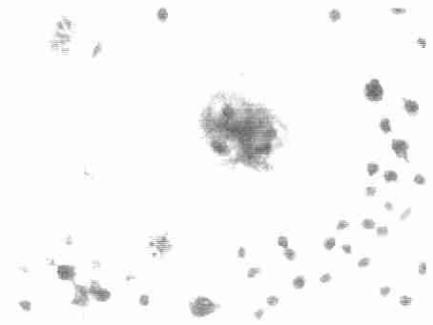
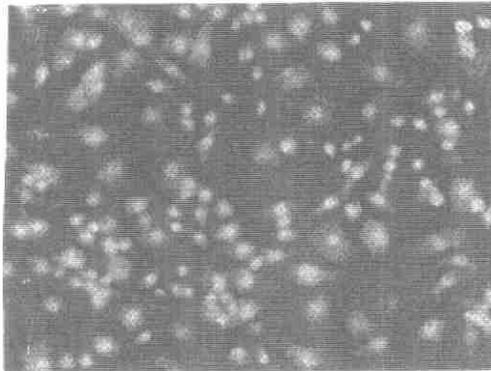
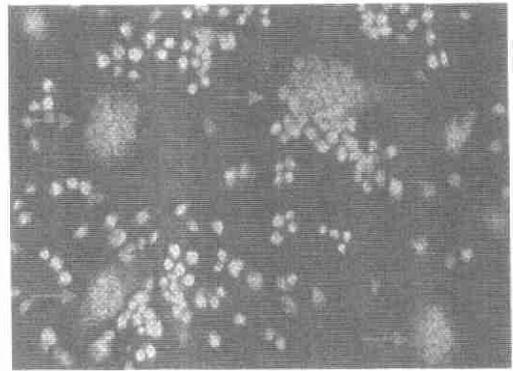


图 2 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞形成破骨细胞的 TRAP 染色



对照组 (0 ng/ml) $\times 200$



RANKL (50 ng/ml) $\times 200$

图 3 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞形成多核细胞

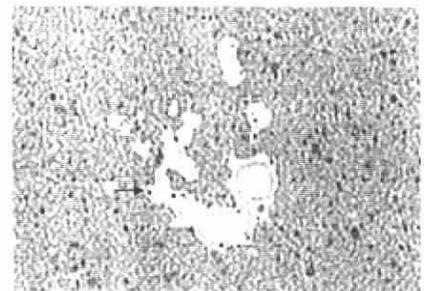
2.4 骨吸收陷窝形成

RAW264.7 细胞在 RANKL 的诱导下形成破骨细胞, 在钙磷覆盖的破骨细胞活性分析板 (OAAS) 上形成骨吸收陷窝 (图 4)。

2.5 破骨细胞表型基因和功能基因的表达

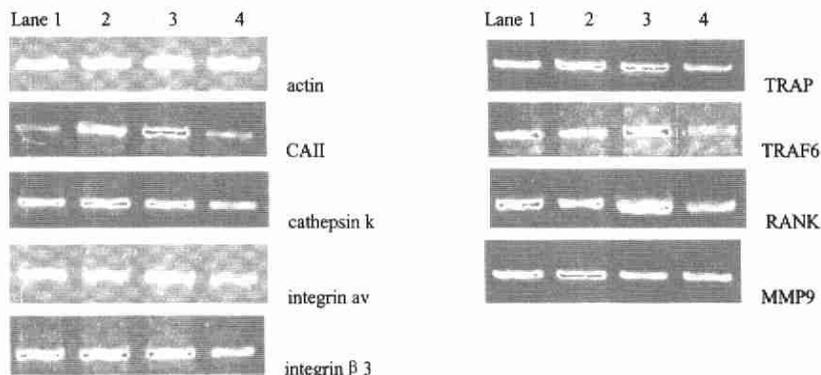
RT-PCR 结果表明, RAW264.7 细胞表达破骨细胞表型基因 (如 RANK、TRAP、MMP9 等) 及骨吸收功能相关基因 (如 Cathepsin K、CAII、integrin 等)。50 $\mu\text{g/ml}$ 的 RANKL 刺激后这些基因的 mRNA 的表达均有不同程度增加, 其中以 CAII、

cathepsinK、TRAP、integrin $\beta 3$ 和 RANK 明显, 与对照组相比 $P < 0.05$ (图 5)。



注: 箭头所指为破骨细胞形成的骨吸收陷凹

图 4 骨吸收陷凹形成



注: 1 至 4 泳道分别表示: RANKL10ng/ml, RANKL30ng/ml, RANKL50ng/ml 及对照组 (RANKL 0ng/ml)

图 5 破骨细胞表型和功能基因的表达

3 讨论

破骨细胞是负责骨吸收功能的细胞。破骨细胞起源于造血干细胞 (HSC) 或骨髓远祖细胞, HSC 分裂为多能单核细胞/巨噬细胞谱系细胞的前体细胞后, 受多种基因调控的细胞因子直接或间接刺激作用, 经增殖、分化、生存与融合发育为多核的成熟破骨细胞, 最后被活化成为功能性破骨细胞。迄今发现, 造血干细胞在发育为功能性破骨细胞的过程中受多种基因调控^[1], 其中调节破骨细胞生成的基因有 PU. 1、M-CSF、ODF、ODAR、c-fos 和细胞核因子 KappaB (NF κ B); 活化破骨细胞的基因有 $\alpha\beta\gamma$ 3、肿瘤坏死因子 (TNF) 受体相关因子 6 (TRAF6)、ODAR、ODF 和细胞原癌基因 c-Src; 与破骨细胞骨吸收有关的基因有 ODF、ODAR、CK、CA II、H⁺ ATP 酶和 Atp6 i (编码破骨细胞特异性质子泵亚单位)。各种激素 (如 PTH、E₂、糖皮质激素、1, 25 (OH)₂D₃ 及 PGE₂ 等) 或细胞因子 (如 TGF β 、IL1、IL11、IL17 及 TNF 等) 与成骨/基质细胞所含的各自受体 (膜受体、胞浆受体或核受体) 结合, 刺激或抑制成骨/基质细胞表达 RANKL 或 OPG, 通过 RANKL 刺激破骨细胞谱系细胞膜上的 RANK 或 OPG 竞争性中和 RANKL 的三角调节关系, 调节破骨细胞分化、活化、吸收与凋亡^[2]。

到目前为止, 还没有成熟的破骨细胞株。目前根据实验的要求, 所需破骨细胞的纯度和数量, 分离纯化破骨细胞的方法各异, 如四肢长骨机械分离法, 操作简单但获得的破骨细胞纯度低; 骨髓诱导培养法, 需成骨细胞系的支持和 1, 25 (OH)₂D₃、地塞米松等促分化的作用, 也不能获得很纯的破骨细胞。而且这些方法均需从动物 (大鼠、小鼠及兔等) 骨髓中获得破骨细胞, 操作复杂且其纯度仍不十分理想。近年来, 对破骨细胞分化调控机制的深入认识, 用 RANKL 和 M-CSF 可直接诱导破骨细胞的产生。许多研究表明, 成骨/基质细胞和骨髓造血细胞的接触是破骨细胞形成所必需的。破骨细胞的形成需要 M-CSF 及单核/巨噬细胞系前身细胞与成骨细胞/骨髓基质细胞、T 和 B 细胞间的接触。这些细胞表达 RANKL, 可与破骨前身细胞或破骨细胞表面的受体 RANK 结合, 促进细胞的增殖和分化, 抑制凋亡。成骨/基质细胞参与了破骨细胞分化、融合及活化的所有阶段, 而 RANKL 和

M-CSF 可取代成骨/基质细胞刺激破骨细胞的形成, 其中 MCSF 是破骨前身细胞增殖和分化必需的^[3,4]。成骨细胞与骨髓基质细胞的共培养形成的破骨细胞可分 3 个阶段^[5]: 0~3d, 无 TRAP 阳性细胞产生; 4~6d, TRAP 阳性的单核细胞形成; 7~10d, TRAP 阳性的多核巨细胞形成, 形成骨吸收陷窝。

RAW264.7 细胞是小鼠源性破骨前体细胞, 来自 Abelson 小鼠白血病病毒所致的肿瘤, 被认为代表早期分化阶段的破骨前身细胞^[6]。用 RANKL 和 M-CSF 诱导 RAW264.7 细胞可获得 TRAP⁺ 的多核细胞, 这种方法所得的破骨样细胞 (OCLs) 不会受其他细胞污染, 便于破骨样细胞形态和功能的研究。从造血干细胞或骨髓远祖细胞分化成成熟的破骨细胞其破骨细胞表型标志物有: MMP9, TRAP, VNR, CTR^[7]。我们研究发现, RAW264.7 细胞可表达代表破骨细胞表型标志的基因, 与破骨细胞的基因表达谱相似。我们的研究与 Hsu 等一致, RAW264.7 的增殖和分化不需要 M-CSF^[8], 仅 RANKL 即可诱导 RAW264.7 细胞成熟有功能的破骨细胞。从而表明 RAW264.7 细胞不是早期分化阶段破骨前身细胞, 可认为是晚期分化阶段的破骨前身细胞。RANKL 刺激 RAW264.7 细胞后部分基因 mRNA 的表达 (尤其是与骨吸收有关的基因如 cathepsin K、CAII、integrin β 3) 明显上调, 进一步表明 RAW264.7 细胞是一种较好的破骨前体细胞模型。

【参 考 文 献】

- [1] Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 2000, 289: 1504-1508.
- [2] 伍贤平, 廖二元, 伍汉文. 破骨细胞及其调节机制的某些进展. *中华内分泌代谢杂志*, 2002, 18: 157-160.
- [3] Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, et al. Macrophage colony stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest*, 1993, 91: 257-263.
- [4] Suda T, Takahashi N, Udagawa N, et al. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Review*, 1996, 20: 345-357.
- [5] Vant Hof RJ, Ralston SH. Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *Bone Miner Res*, 1997, 12: 1797-1804.
- [6] Battaglini R, Kim J, Vaage B, et al. C-mys is required for osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res*, 2002, 5: 763-773.

- [7] Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocrine Reviews*, 1996, 17: 308-332.
- [8] Hsu H, Lacey D, Dunstan C, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentia-

tion and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 3540-3545.

收稿日期: (2004-08-01)

(上接第150页)

OA对骨质疏松性骨折愈合影响的研究来循证骨性关节炎与骨质疏松呈负相关,是否会对骨折的愈合产生影响以及产生怎样的影响。

本实验结果表明,虽然OVX+OA+F与OVX+F比较BMD和骨组织形态计量学参数有所增加,但是统计学上差异无显著性,因此尚不能确定骨性关节炎是否对骨质疏松性骨折的愈合有促进作用。

综上所述,骨质疏松不仅延缓骨折愈合过程,而且降低骨折愈合质量。虽然有研究表明骨性关节炎延缓了骨质疏松的发展,但是,本实验尚未发现OA对骨质疏松性骨折的愈合产生确切促进作用。

【参 考 文 献】

- [1] Dequeker J. The relationships between osteoporosis and osteoarthritis. *Clin Rheum Dis*, 1985, 11: 271-276.
- [2] Verstraeten A, Ermen HV, Haghebaert MSG, et al. Osteoarthritis retards the development of osteoporosis. *Clin Orthop*, 1991, 264: 169-177.
- [3] Dequeker J, Patric G, Roland U. Osteoporosis and osteoarthritis. Anthropometric distinction. *JAMA*, 1983, 249: 1448-1451.
- [4] Margulies JY, Payzer A, Nyska M. The relationship between degenerative changes and osteoporosis in the lumbar spine. *Clin Orthop*, 1996, 324: 145-147.
- [5] Healey JH, Vigorita VJ, Lane JM. The coexistence and characteristics of osteoarthritis and osteoporosis. *J Bone Joint Surg*, 1985, 67: 586-589.
- [6] Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, et al. Osteoporosis influences

the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *Steroid Biochem Mol Bio*, 1999, 68: 197-202.

- [7] 张先龙, 睦述平, 曾炳芳. 骨质疏松对卵巢切除大鼠骨折愈合影响的超微结构研究. *中华外科杂志*, 2001, 39: 241-243.
- [8] 黄遂柱, 赵永强, 陈凤苞, 等. 雌激素对实验性骨质疏松症骨折愈合的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2000, 6: 65-68.
- [9] Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone*, 2001, 28: 80-86.
- [10] Ernst M, Heath JK, Rodan CA. Estradiol effects on proliferation messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-1, and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bone. *Endocrinology*, 1989, 125: 825-831.
- [11] Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology*, 1999, 140: 4367-4370.
- [12] Einborn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop*, 1998, 355: S7-S21.
- [13] Stewart A, Black A, Robins SP, et al. Bone density and bone turnover in patients with osteoarthritis and osteoporosis. *J Rheumatol*, 1999, 42: 483-489.
- [14] Sowers M, Lachance L, Jamadar D, et al. The association of bone mineral density and bone turnover markers with osteoarthritis of the hand and knee in pre and perimenopausal women. *Arthritis Rheum*, 1999, 42: 483-489.
- [15] Arden NK, Nevitt MC, Lane NE, et al. Osteoarthritis and risk of falls, rates of bone loss, and osteoporotic fractures. *Arthritis Rheum*, 1999, 42: 1375-1378.

(收稿日期: 2004-08-01)