

复合振动抑制 RAW264.7 细胞分化成熟

巫松辉 钟招明 查丁胜 陈建庭

中图分类号: R454.4 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)07-0564-04

摘要: 目的 研究复合振动对核因子- κ B 受体活化因子配体(RANKL)诱导的 RAW264.7 细胞分化的影响,探讨复合振动对破骨细胞分化的影响及机制。方法 RAW264.7 细胞 RANKL 诱导培养 3 或 4d 并施加复合振动干预,通过抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色观察 TRAP 阳性多核细胞形成的变化,real-time RT-PCR 分析破骨细胞特异性基因组织蛋白酶 K (cathepsin K),金属蛋白酶-9 (MMP-9)和 TRAP 表达的变化。结果 复合振动能抑制 RANKL 诱导破骨细胞形成,下调破骨细胞特异基因 cathepsin K, MMP-9 和 TRAP 的表达。结论 RANKL 促进 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化,并增加特异基因的表达,但 RANKL 的促进作用受复合振动抑制。这进一步的阐释复合振动抗骨质疏松的作用机制。

关键词: RAW264.7 细胞; RANKL; 破骨细胞; 细胞分化

Compound vibration inhibits RAW264.7 cell differentiation WU Songhui, ZHONG Zhaoming, ZHA Dingsheng, et al. Department of Orthopedic and Spinal Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: CHEN Jianting, Email: chenjt99@tom.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of compound vibration on osteoclast differentiation using receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)-treated RAW 264.7 cells, and to explore the mechanism of compound vibration on osteoclast differentiation. **Methods** RAW264.7 cells in the presence of RANKL were treated with or without compound vibration for 3 or 4 days. Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP)-positive multinuclear cells (MNCs) were examined using TRAP staining. Expression of the osteoclast-specific genes, such as TRAP, cathepsin K, and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), were analyzed using real-time RT-PCR. **Results** Compound vibration significantly decreased the number of TRAP-positive MNCs, and down-regulated the mRNA expression of cathepsin K, MMP-9, and TRAP. **Conclusions** RANKL stimulated osteoclast differentiation by RAW264.7 cells, and stimulated the expression of osteoclast-specific genes. The RANKL-induced stimulation was inhibited by compound vibration. The finding further explored the anti-osteoporosis mechanism of compound vibration.

Key words: RAW264.7 cell; RANKL; Osteoclast; Cell differentiation

骨质疏松症是一种以骨量减少、骨组织微结构退化为特征,以致骨的脆性增高而骨折危险性增加的一种全身性、系统性代谢性骨病^[1]。骨重塑是一个成骨细胞骨生长和破骨细胞骨吸收的渐进、循环性过程。当破骨细胞活性增加时,骨吸收大于骨生长,出现骨重塑失衡和骨量丢失。骨量丢失导致一

系列疾病的发生,其中骨质疏松症作为一个危害大,治疗耗资大,社会负担重的公共卫生问题引起全世界的广泛关注。骨质疏松症的发病机制、病因尚未完全清楚。目前,骨质疏松症的治疗大部分集中在抑制破骨细胞的吸收上^[2]。近年来,振动因其显著的成骨效应及非侵入性,无创,不良反应小等特点,被运用于防治骨质疏松症,骨折愈合,预防骨量丢失上,前景广阔。既往研究表明复合振动能促进成骨细胞增殖分化^[3],增加骨密度^[4],而复合振动在破骨细胞分化方面的研究尚未报导。本实验研究复合振动对破骨细胞分化及特异性基因表达的影响,旨

基金项目: 广东省科技计划项目 (2008B030301343)

作者单位: 510515 广州,南方医科大学南方医院脊柱骨病外科

通讯作者: 陈建庭, Email: chenjt99@tom.com

在探讨复合振动对破骨细胞分化的影响及机制。为复合振动防治骨质疏松症提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要的试剂 胎牛血清(FBS)、RPMI-1640 培养基、双抗、无酚红 α -MEM (Gibco); TRAP 染色试剂盒 (Sigma); RANKL (R&D); 活性碳吸附型血清 (Bioind); M-MLV 反转录试剂盒 (Invitrogen); Trizol,

SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒 (Takara)。

1.1.2 复合振动仪 复合振动仪自主设计研制, 主要包括控制器和振动台两部分。振动台可振动置于台上的细胞, 而控制器控制并监测着振动的强度及频率。垂直振动与水平振动每 10s 交替进行构成复合振动 (见图 1)。实验时, 复合振动组给予高频低强度复合振动 (0.3 g, 45 Hz, 15 分/次, 1 次/天); 而对照组及 RANKL 组置于相同的平板上不予振动。

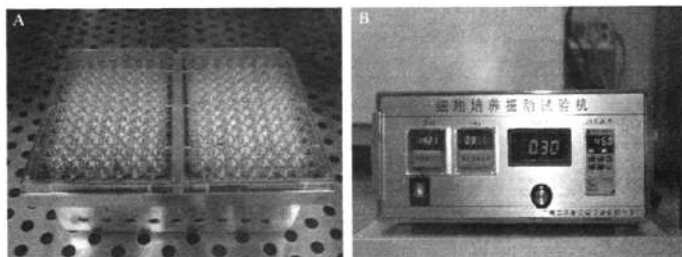


图 1 复合振动仪 A 振动台 B 控制器

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: RAW264.7 细胞接种于含 4ml 完全培养基的 25cm² 培养瓶中, 在 37℃ 含 5% CO₂ 湿化空气的培养箱中培养。其中完全培养基是含有 10% FBS, 2mmol/L 谷氨酰胺, 100 IU/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养基。而在诱导阶段, 要用诱导培养基培养, 诱导培养基是含 10% 活性碳吸附型血清的无酚红 α -MEM 培养基。

1.2.2 复合振动对破骨细胞分化的影响: RAW264.7 细胞以 3×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板上, 每孔加 200μl 完全培养基。细胞贴壁后换成 200μl 诱导培养基, RANKL 组及复合振动组再加 1μl RANKL (10μg/ml), 使其终浓度为 50ng/ml, 每 3d 换 1 次液, 换液时加入相应量的 RANKL, 持续诱导培养 4d 后, 弃培养基, PBS 缓冲液洗 1 次, 按 TRAP 染色试剂盒说明进行染色, 倒置显微镜下观察。以 TRAP 染色阳性, 细胞核 ≥ 3 个为破骨细胞。

1.2.3 复合振动对破骨细胞特异性基因表达的影响: RAW264.7 细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板上, 每孔加 2ml 完全培养基。具体培养方法同前。细胞培养 3d 后用 Trizol 提取总 RNA, 并用 M-MLV 反转录试剂盒反转录为 cDNA, 并用 DEPC 水稀释 10 倍。按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒说明书采用 20μl 反应体系, cDNA 2μl。引物序列如下: MMP-9: 5'-GCC CTC GAA CTC ACA CGA CA-3',

5'-TTG GAA ACT CAC ACG CCA GAA G-3', 扩增产物为 85bp。Cathepsin K: 5'-CAG CAG AAC GGA GGC ATT GA-3', 5'-CCT TTG CCG TGG CGT TAT AC-3', 扩增产物为 85bp。TRAP: 5'-CTA CCT GTG TGG ACA TGA CCA-3', 5'-GCA CAT AGC CCA CAC CGT TC-3', 扩增产物为 65bp。GAPDH: 5'-AAA TGG TGA AGG TCG GTG TG-3', 5'-TGA AGG GGT CGT TGA TGG-3', 扩增产物为 108bp。Real-time RT-PCR 反应过程在 ABI7500 仪器上完成, 其中反应条件是: 先 95℃ 预变性 30s, 再 95℃ 变性 5s, 60℃ 退火 34s, 40 次循环。溶解曲线验证基因的特异性, 而基因的表达则用相对 Ct 方法进行计算。

1.2.4 统计学分析: 实验所得到的结果均以均数 $\pm$ 标准差表示。采用 SPSS 13.0 统计学软件对实验数据进行分析, 各组总体比较运用单向方差分析, 组间两两比较采用 Dunnett's T3 法分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 复合振动抑制破骨细胞形成

通过对培养的细胞进行 TRAP 染色, 观察复合振动对破骨细胞分化的影响。诱导培养 4 天后进行 TRAP 染色, 可见对照组都是 TRAP 染色阳性的单核细胞, 细胞呈集落式生长, 而 RANKL 组则出现许多 TRAP 染色阳性多核细胞 (≥ 3 核) 即破骨细胞, 细

胞大,胞浆成空泡状,染成淡红(图2)。但是复合振动组的 TRAP 染色阳性多核细胞较 RANKL 组明显减少,提示复合振动抑制 RANKL 诱导 RAW264.7

细胞向破骨细胞分化($P=0.002$)。同时发现,复合振动组大破骨细胞(≥ 10 核)也明显少于 RANKL 组($P<0.001$)(图3)。

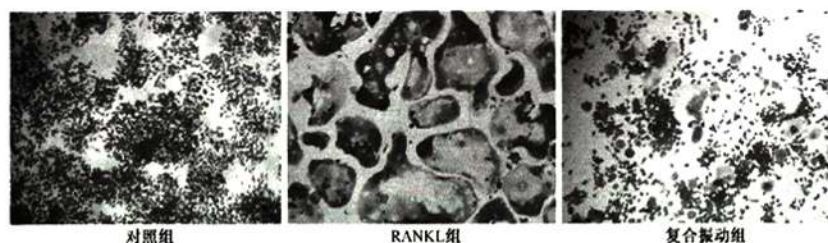


图2 诱导培养4d后进行TRAP染色($\times 100$)

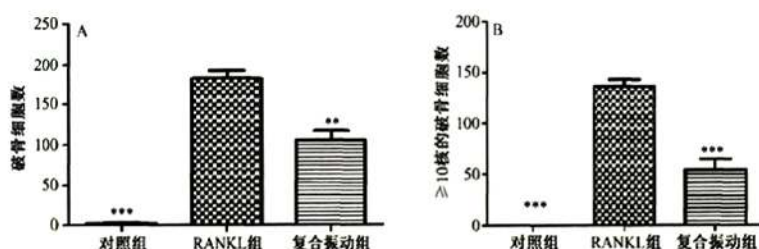


图3 A 复合振动对破骨细胞形成的影响;B 复合振动对破骨细胞核的数量影响

2.2 复合振动抑制破骨细胞特异性基因的表达

观察破骨细胞特异性基因 cathepsin K, MMP-9 和 TRAP 的表达,研究复合振动对破骨细胞分化成熟的影响。实验发现,RANKL 促进基因 cathepsin K, MMP-9 和 TRAP 的表达,但是这种促进作用在复合振动的作用下出现下降的趋势($P<0.01$)(图4)。这进一步验证了复合振动抑制破骨细胞的分化。

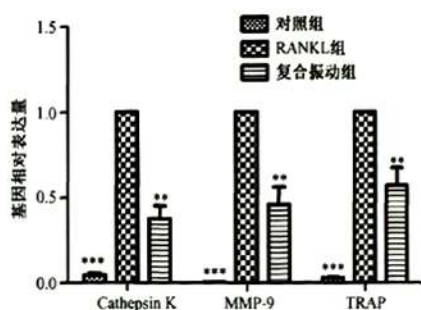


图4 复合振动对 TRAP, cathepsin K 和 MMP-9 基因表达的影响

3 讨论

根据 Wolff 原理,骨生长与机械负荷紧密联系。

2001 年 Rubin 等证实机械刺激促进松质骨形成^[5], 振动作为一种机械负荷同样也被广泛地应用于成骨方面研究。本实验用复合振动对 RAW264.7 细胞分化进行干预,发现复合振动抑制破骨细胞分化成熟。

TRAP, cathepsin K 和 MMP-9 作为破骨细胞的特异性基因,也是破骨细胞成熟的标志^[6]。我们通过 TRAP 染色和 real-time RT-PCR 发现复合振动抑制破骨细胞的生成,同时降低 TRAP, cathepsin K 和 MMP-9 基因的表达。这表明复合振动抑制破骨细胞的分化成熟。机械刺激的其他相关研究结果支持本实验结果^[7]。

破骨细胞的骨吸收过程是一个复杂的过程。破骨细胞前体细胞融合形成破骨细胞,成熟的破骨细胞游走吸附于骨表面进行细胞骨架的重构并形成一个密闭的空间,同时分泌一定的水解酶,对骨质起到吸收的作用^[6]。MMP-9 促进破骨细胞向骨表面吸附,并启动骨吸收^[8]。而 TRAP 和 cathepsin K 是破骨细胞分泌的两种主要的水解酶,促进对骨质的吸收^[6]。研究表明,骨吸收功能还与破骨细胞核的数量密切相关,核数多的破骨细胞吸收活性更加强大^[9]。本实验研究发现复合振动抑制破骨细胞核数的增加,real-time RT-PCR 结果显示无论是 MMP-

9 还是 TRAP 和 cathepsin K 都在复合振动的作用下呈下降趋势。这提示复合振动不但抑制破骨细胞的形成,还降低破骨细胞的骨吸收活性。

本实验运用复合振动直接对破骨细胞分化进行干预,证实复合振动可抑制破骨细胞的分化成熟。这为复合振动防治骨质疏松症提供一定的理论依据。

【参 考 文 献】

- [1] Lash R W, Nicholson J M, Velez L, et al. Diagnosis and management of osteoporosis. Prim Care, 2009, 36(1): 181-198.
- [2] Rodan G A, Martin T J. Therapeutic approaches to bone diseases. Science, 2000, 289(5484): 1508-1514.
- [3] 查丁胜, 陈建庭, 邓轩庚, 等. 不同频率振动应变对成骨细胞增殖及分化能力的影响. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(5): 303-307.
- [4] 陈建庭, 邓轩庚, 冯鹰, 等. 复合振动治疗卵巢切除大鼠骨质疏松的初步试验研究. 中国老年学杂志, 2008, 28(9): 842-844.
- [5] Rubin C, Turner A S, Bain S, et al. Anabolism-Low mechanical signals strengthen long bones. NATURE, 2001, 412(6847): 603-604.
- [6] Boyle W J, Simonet W S, Lacey D L. Osteoclast differentiation and activation. Nature, 2003, 423(6937): 337-342.
- [7] Suzuki N, Yoshimura Y, Deyama Y, et al. Mechanical stress directly suppresses osteoclast differentiation in RAW264.7 cells. Int J Mol Med, 2008, 21(3): 291-296.
- [8] Ishibashi O, Niwa S, Kadoyama K, et al. MMP-9 antisense oligodeoxynucleotide exerts an inhibitory effect on osteoclastic bone resorption by suppressing cell migration. Life Sci, 2006, 79(17): 1657-1660.
- [9] Ishii M, Sacki Y. Osteoclast cell fusion: mechanisms and molecules. Mod Rheumatol, 2008, 18(3): 220-227.

(收稿日期: 2010-12-28)

第四届全国脊柱非融合与融合技术研讨会 暨首届全国椎间盘镜技术学习班通知

由国际脊柱功能重建学会中国分会(SASCB)、中国老年学学会骨质疏松委员会、《中国脊柱脊髓杂志》编辑部、《中国骨质疏松杂志》编辑部、中国人民解放军总参谋部总医院、中国人民解放军空军总医院、中国人民解放军海军总医院、中国人民解放军总装备部总医院联合主办的“第四届全国脊柱非融合与融合技术研讨会暨首届全国椎间盘镜技术学习班”(2011 年国家级继续教育项目, 编号: 2008-04-07-017)定于 2011 年 9 月 16~18 日在北京召开。

研讨会将邀请国内、外该领域著名专家和学者发言, 探讨脊柱非融合与融合领域的基本理论, 重点介绍临床应用技术及最新进展, 并针对临床疑难问题及病例开展讨论。主要内容包括: 半刚性椎弓根动态稳定、棘突间动态固定、人工椎间盘置换、同种异体椎间盘置换、椎间关节成形术以及各种脊柱前路融合等技术要点。研讨会将安排专门时间进行病例讨论及争论性发言, 欢迎各位参会代表携带病例进行交流讨论, 参会者可获得国家级一类继续教育学分。

椎间盘镜技术学习班将邀请国内著名脊柱微创外科专家与会, 采用专家辅导, 分组模型操作和手术讲解等方式授课, 并从临床实用角度, 结合典型病例, 现场互动讨论, 参会学员可获得全军继续教育学分。

会期安排: 2011 年 9 月 16 日 14~22 时报到, 17 日非融合与融合新技术研讨会, 18 日上午椎间盘镜技术学习班。

会议地点: 北京市海淀区五棵松路北甲八号鸿府大厦。

报名方式: 欢迎以 E-mail 方式和手机短信报名。报名时请注明姓名、性别、职称、单位、联系电话、详细通讯地址、E-mail 地址等。

会务费: 1000 元, 住宿统一安排, 费用自理。

联系地址: 北京市海淀区黑山扈甲 17 号总参谋部总医院骨科 100091

联系人: 胡 明 13701398979 E-mail: huming309@hotmail.com

刘海容 13910070929

复合振动抑制RAW264. 7细胞分化成熟

作者: [巫松辉](#), [钟招明](#), [查丁胜](#), [陈建庭](#)
作者单位: [南方医科大学南方医院脊柱骨病外科, 广州, 510515](#)
刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)
年, 卷(期): 2011, 17 (7)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201107002.aspx