中国骨质疏松杂志 2013 年 3 月第 19 卷第 3 期 Chin J Osteoporos, March 2013, Vol 19, No. 3
Published online www. wanfangdate. com. cn doi:10. 3969/j. issn. 1006-7108. 2013. 03. 012


·论著·

# 骨保护素体外抑制小鼠单核巨噬细胞成熟分化的实验研究

王信 罗艳 廖文波

**中图分类号**：R322.7⁺1;R329.2⁺4;R681.1 **文献标识码**：A **文章编号**：1006-7108(2013)03-0247-05

**摘要**：**目的** 研究骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)抑制核因子 NF-κB 受体活化因子配体(Receptor activator of nuclear kappa B ligand, RANKL)诱导小鼠单核细胞 RAW264.7 成熟分化而导致的溶骨效应。**方法** 50 ng/mL RANKL 诱导 RAW264.7 细胞 1 d 后，加入 100 ng/mL OPG(实验组，即 OPG + RANKL 组)或不加入 OPG(对照组，即 RANKL 组)分别培养 7 d 和 9 d，经细胞形态学观察其变化，抗酒石酸酸性磷酸酶(Tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色法观察 TRAP 阳性多核细胞，扫描电镜下观察在骨片上的破骨细胞所致的骨吸收陷窝形成情况。**结果** 对照组培养 7 d 时，在倒置相差显微镜、透射电镜、光镜下可见细胞形状为椭圆形或不规则形，胞体明显较 RAW264.7 细胞增大，胞核多为 6～10 个，扫描电镜下还可见大量伪足形成，而实验组培养 7 d 后，细胞形状多为圆形，且扫描电镜下未见明显伪足形成；对照组 9 d 时可见大量 TRAP 染色阳性的多核巨细胞(含 3 个或 3 个以上的细胞核)，而实验组中 TRAP 染色阳性的多核破骨细胞偶见多核巨细胞，培养 9 d 时很难找到多核巨细胞；仅用 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞分化 7 d 时，对照组中破骨细胞表面可见大量伪足伸出，并形成明显的骨吸收陷窝，实验组中破骨细胞见少许伪足突出，不能看到明显的骨陷窝形成。**结论** 单用 50 ng/mL RANKL 体外连续诱导 RAW264.7 细胞 7 d 时，可以促进成熟的破骨细胞显著分化。100 ng/mL OPG 培养 9 d 能有效地抑制破骨细胞的分化，减少破骨细胞的骨吸收效应。

**关键词**：破骨细胞；骨质疏松；RAW264.7 细胞；RANKL；OPG

**Study on osteoprotegerin in inhibitation of mouse osteoclast precursor cell differentiation** *WANG Xin, LUO Yan, LIAO Wenbo. Department of Spine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi* 563000, China

Corresponding author: LIAO Wenbo, Email: wenbo900@ sina. com

**Abstract**: **Objective** To observe whether OPG is effective in inhibiting the effect that RANKL induce RAW264.7 cells to differentiation to mature osteoclast. **Methods** RAW264.7 cells were solely treated with 50 ng/ml RANKL for 1 day, which then were divided into two groups: the one is an OPG group involving 100 ng/ml OPG and 50 ng/ml RANKL, the other is a control group only containing 50 ng/ml RANKL. After the period between 7 and 9 d, cells morphological changes can be investigated by Inverted Phase Control Microscope (IPCM), Transmission Electron Microscope (TEM), Scanning Electron Microscope (SEM) and Light Microscope respectively; Furthermore, Staining TRAP-positive multinucleated cells can be detected by IPCM; The resorption pits of bone slices were indicated through SEM. **Results** It is very clear that the sharp of RAW264.7 cells became oval or irregular, and their bodies go bigger significantly including 6 up to 10 nucleus in control group by means of IPCM, TEM and Light Microscope. Interestingly, we also have found that there were considerable pseudopodia-like protrusions attaching to the surface of these cells by Scanning Electron Microscopy in the control group. By contrast, the research result is polar in OPG group.

基金项目：贵州省科技厅遵义医学院遵义市科技局联合基金(黔科合 J 字 LKZ[2012]07 号)

作者单位：563000 遵义，遵义医学院附属医院脊柱外科(王信、廖文波)；遵义医学院附属医院新生儿科(罗艳)

通讯作者：廖文波，Email：wenbo900@ sina. com

The outcome of experiment has further demonstrated that RAW264.7 cells treated by RANKL in consecutive 7 days performed more highly dramatic numbers of staining TRAP-positive multinucleated osteoclasts (more than 3 nucleus) in control group than corresponding OPG group; Finally, in terms of the number of bone resorption formation, control group has overwhelmingly outweighed than the OPG group. **Conclusion** RAW264.7 cells could be successfully induced differentiation to mature osteoclasts on the condition of single 50ng/ml RANKL, especially in excess of 7 d. The interference of 100 ng/ml OPG in 9 days could be extremely beneficial to inhibit the process in osteoclasts differentiation and reduce the effect on bone resorption in an effective approach.

**Key words**: Osteoclasts; Osteoporosis; RAW264.7 cells; RANKL; OPG

21 世纪,全世界面临着重点攻关的三大老年疾病之一,即骨质疏松症(Osteoporosis, OP)。据统计,全球 OP 患者人口已超过 2 亿,其中我国约 9000 万,占我国总人口 7%[1]。OP 并发的溶骨性骨折,致残率极高,给社会和家庭带来沉重的经济负担。破骨细胞(Osteoclast, OC)是骨质疏松中最主要的骨吸收效应细胞,而 OC 的正常分化成熟需要核因子 NF-κB 受体活化因子配体(Receptor activator of nuclear kappa B ligand, RANKL)。当 RANKL 与破骨前体细胞(Osteoclast precursors, OCP)细胞膜上 RANK 的受体结合后,从而启动破骨细胞内特异性基因表达的关键信号,进一步诱导 OCP 分化为成熟的 OC 细胞,继而发挥溶骨效应,最终导致骨质破坏。骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)是由骨髓基质/成骨细胞(Osteoblast ,OB)分泌的一种能与 RANKL 相结合的可溶性"圈套"受体,当 OPG 抢先占领 RANKL 后,间接就阻断了 RANKL 与破骨细胞前体细胞表面的 RANK 受体结合,从而抑制 OCP 的成熟分化,达到防止骨质过度吸收的目的。本次实验旨在观察 OPG 对体外 OC 分化的影响,为进一步探索干预 OC 骨吸收效应奠定一定的实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

DEME 高糖培养基(美国 GIBCO 公司),胎牛血清(美国 GIBCO 公司),小鼠重组 sRANKL(美国 PeproTech 公司),OPG 试剂(RND 公司),TRAP 染色试剂盒(美国 Simga 公司),RT-PCR 逆转录试剂盒(北京 TIANGEN 公司)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1** RAW264.7 细胞培养:小鼠单核/巨噬细胞系(RAW264.7 细胞)用含 10% 胎牛血清(FBS)的高糖 DMEM 培养基(其中含 50 U/mL 青霉素和链霉素),在 37 ℃,5% $CO_2$ 条件下培养箱中培养,每隔 2 ~3 d 常规更换培养液 1 次。

**1.2.2** 倒置显微镜、透射电镜和扫描电镜下观察破骨细胞形态:单用 50 ng/mL RANKL 处理 RAW264.7 细胞 1 d 后,向其中加入 100 ng/mL OPG(实验组)或不加入 OPG(对照组)继续培养 7 d 和 9 d 后,每隔 2 d 换液 1 次,更换培养液时,同时实验组加入 50 ng/mL RANKL + 100 ng/mL OPG,对照组仅加入 50 ng/mL RANKL,Nikon 倒置相差显微镜下观察其形态。7 d 和 9 d 时分别取培养基中的细胞予以胰酶消化,细胞悬液收集到 5 mL 的 EP 管中,总数达 $1 \times 10^7$ 以上,以 1 200 r/min 离心 15 min,弃上清液后,固定、脱水,环氧树脂常规浸透、包埋、聚合,制备切片、染色,透射电镜下观察其形态。细胞处理如前,弃培养液,PBS 反复冲洗 4 ~5 次,固定、单宁酸处理,弃废液,脱水、干燥、喷金后,在扫描电镜观察其一般形态。

**1.2.3** HE 染色:将盖玻片置于无菌 6 孔板中,以 $1 \times 10^7$ 个/孔接种 RAW264.7 细胞,培养过夜后,弃培养液,同上法处理,充分固定,行 HE 组织染色,在光镜下观察其细胞形态。

**1.2.4** 破骨细胞特异性染色:细胞如同上述方法处理,行抗酒石酸酸性磷酸酶染色,步骤参照 TRAP 染色试剂盒说明书进行。

**1.2.5** 骨片扫描电镜检查:取新鲜小鼠颅骨,制成面积为 1 cm × 1 cm,厚度约 65 μm 左右的薄骨片,清洗 4 ~5 次,每次 20 min 以上,置于 4℃冰箱保存。使用前取出浸泡在 75% 酒精过夜后,并在紫外线照射 8 h 以上。以 $1 \times 10^7$ 个/孔接种 RAW264.7 细胞于薄骨片上,予以 50 ng/mL RANKL 干预 1 d 后,如上述方法继续培养 7 d 和 9 d,无菌 PBS 冲洗,戊二醛固定,锇酸固定,脱水,$CO_2$ 干燥,镀金,最后观察骨吸收陷窝形成情况。

**1.2.6** 统计学分析:组间比较应用方差分析的方法,使用的软件是 SPSS 13.0 版本。数据表达均使用均数 ± 标准误差形式,$P$ 值 $< 0.05$ 表示有显著差异。

## 2 结果

### 2.1 形态学观察

倒置显微镜下所示经 RANKL 连续诱导 RAW264.7 细胞 7d 时，具有较强的贴壁性，且形态多为类圆形和不规则形，实验组中细胞多为圆形，伪足形成明显减少（如图 1：A1、A2）。透射电镜显示对照组中可见破骨细胞为多核巨细胞，细胞核内染色质分布较均匀，而实验组中未见明显多核巨细胞形成，核仁可见核桥（如图 1：B1、B2）。扫描电镜下提示对照组破骨细胞胞体增大，形态欠规则，细胞表面可见大量伪足样突出。而实验组中普遍胞体较小，细胞表面无明显伪足突出（如图 1：C1、C2）。

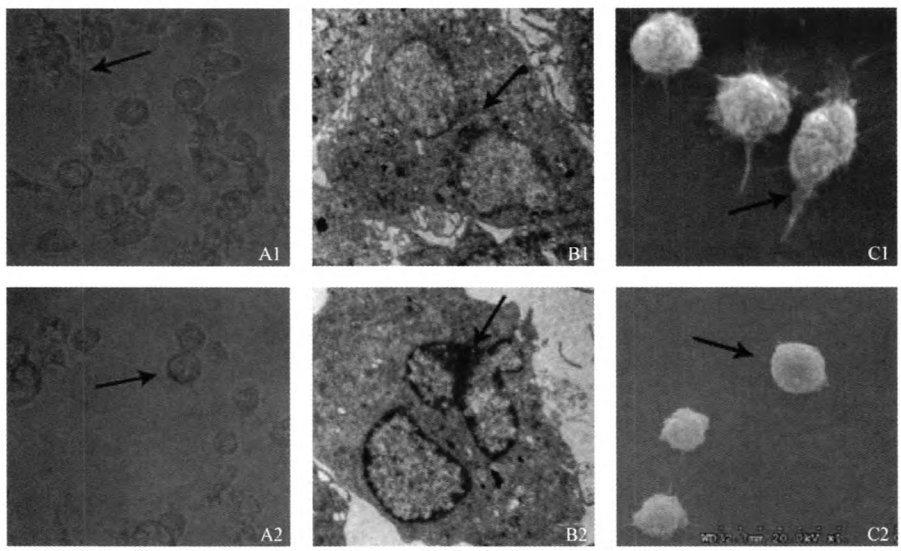


**图 1** 两组在倒置显微镜、透射电镜和扫描电镜下的形态学情况

**Fig. 1** The morphology were displayed by IPCM, TEM and SEM in both groups

（A1、B1、C1 为对照组；A2、B2、C2 为实验组. A 组 ×400；B 组 ×8000；C 组 ×1000）

（Control group: A1, B1, C; OPG group: A2, B2, C2. A group ×400, B group ×8000, C group ×1000）

### 2.2 HE 染色结果

HE 染色后镜下可见对照组中培养 7d 的细胞，胞体显著增大，胞质较丰富，细胞边缘不整齐，胞核常为 6～10 个，呈典型多核表现，细胞核染色质分布较均。而实验组中细胞胞体普遍较小，且多核不明显（如图 2）。

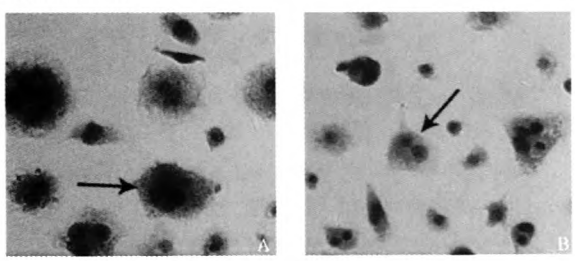


**图 2** 两组在 HE 染色下的形态学变化

**Fig. 2** The morphology were showed by HE staining in both groups

（A 为对照组、B 为实验组，×400）

（Control group: A; OPG group: B. ×400）

### 2.3 TRAP 染色结果

单用 50 ng/mL RANKL 处理 RAW264.7 细胞后的对照组，7 d TRAP 阳性细胞显著增多，胞浆被染成典型的玫瑰红，细胞核被苏木精染成深蓝色，细胞核数目常为 6～10 个。而实验组中，7d TRAP（+）细胞中偶见多核巨细胞，9d 很难找到 TRAP 染色阳性细胞，胞浆很少被染成玫瑰红色（如图 3）。

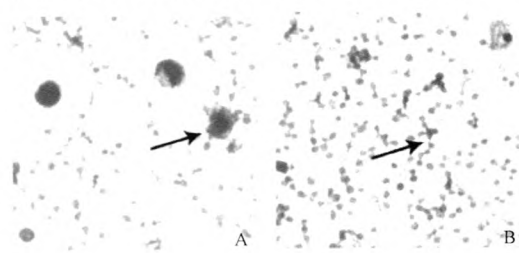


**图 3** TRAP 染色结果

**Fig. 3** The result of TRAP staining in both group

（A 为对照组、B 为实验组，×200）

（Control group: A; OPG group: B. ×200）

### 2.4 骨片扫描电镜观察

单用 50 ng/mL RANKL 诱导 RAW264.7 细胞 7 d 分化为成熟的破骨细胞，对照组可见显著的破骨细胞发挥的骨吸收效应，扫描电镜下可以看到 OC

在薄骨片表面形成的骨吸收陷窝表现。实验组中 7 d 偶见破骨细胞表面少许伪足伸出，但不能形成骨质的明显破坏(如图 4)。

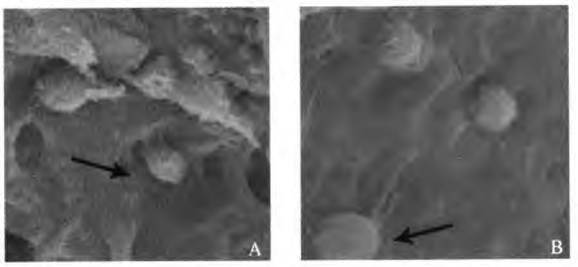


**图 4** 两组在骨片上破骨细胞形成骨陷窝情况

**Fig. 4** Bone resorption formation on bone slices in both group

(A 为对照组 ×700、B 为实验组 ×800)

(Control group: A; OPG group: B. ×800)

## 3 讨论

人体骨组织是处于骨重建和骨吸收的动态过程中的，即 OB 的骨形成和 OC 的骨吸收的动态平衡。而 OP 的发生则与骨重建失衡导致的骨量丢失过多息息相关，病理状态下，骨形成的周期相比骨吸收的周期较长，新骨的形成不足以弥补骨量的丢失，从而导致骨质总量的进行性下降[2]。OC 的正常分化成熟需要必备的两个受体：第一个是单核-吞噬细胞膜上表达酪氨酸激酶受体，如：c-Fms；第二个则是肿瘤坏死家族受体，如：RANK 受体。这一转变过程，并非是一个直接的过程，而是一复杂的多细胞及其衍生物的细胞因子之间的交互对话的过程。当细胞因子作用于巨噬细胞、基质/成骨细胞等后，它们将释放出两个促进 OC 分化和成熟所必须的因子：其一是巨噬细胞集落刺激因子(Macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)，其二是 RANKL[3]。基质/OB 释放的 RANKL 能与 OCP 细胞膜上 RANK 受体相结合，继而引起 OCP 的胞内部分特异性地与胞质内肿瘤坏死因子受体相关因子(TNF receptor associated factor, TNAFs)结合，启动 OC 成熟分化的程序。所以 RANK 受体信号传入 OCP 内，是关乎 OC 能否成熟分化的至关重要一步，而反之推论 RANKL 是调节 OC 分化、激活、成熟、凋亡等一系列过程最重要的因子[4]。值得一提的是，破骨样细胞 RAW264.7，它源自于小鼠白血病病毒所致的肿瘤细胞，曾一度被公认为是一种比较理想的破骨前体细胞模型[5]。

正常生理状态下，骨髓基质/OB 除了分泌 RANKL 等细胞因子以外，还可以分泌 OPG 与 RANK 受体竞争结合 RANKL，从而防止骨质的过度吸收[6,7]。OPG 是 Simonet 等[8]在 1997 年发现的一种分泌型糖蛋白，它也是肿瘤坏死因子受体超家族成员之一，可由多种间充质细胞衍化的细胞所分泌，如：血管平滑肌细胞、骨髓间质细胞、OB、内皮细胞等[9]。OPG 具有抑制 OC 分化、抑制成熟 OC 的活性并诱导其凋亡的功能[10]。OPG 和 RANKL 在维持骨量和调节骨重建的过程中，发挥着重要作用[11]。所以，RANKL/OPG 比例的平衡是维持局部骨代谢平衡的关键[12]。

本次实验中我们通过直接运用单剂量的 OPG，观察其降低 OC 的成熟分化，从而达到预防和治疗骨质疏松。结果表明实验组(100 ng/mL OPG + 50 ng/mL RANKL)与对照组(50 ng/mL RANKL)比较，从形态学、组织学、特殊染色和骨陷窝形成情况等多个指标均说明 100 ng/mL OPG 连续干预第 9d 时，可以见到明显的 OC 分化抑制作用，降低骨溶解，而 7d 时抑制效果不明显。另一方面也说明了单用 50 ng/mL RANKL 第 7d 可以显著促进 RAW264.7 细胞向成熟的 OC 分化，这与我们前期的实验结果是相同的[13]。本次试验的主要意义是，为我们下一步的实验方案中，设想通过加入更多抑制 OC 成熟分化等细胞因子，如白介素-6、白介素-10、白介素-17 等，并且从基因的层面上，构建目的基因的质粒，通过病毒载体，让它们在去势动物体内恒定表达，从而长期发挥抑制效应，打好一定的前期体外实验基础。我们拟在体外将这些因子联合运用，可能会产生更高的协同效应，减小 OC 的破骨效应，为今后的动物实验以及基因方面上提供新的实验依据。

## 【参考文献】

[1] 黄传兵. 骨质疏松症的危险因素及防治. 中国初级卫生保健, 2003, 17(3): 76.
Huang CB. The risk factors and prevention of osteoporosis. Chinese Primary Health Care, 2003, 17(4): 76.

[2] Deal C. Potential new drug targets for osteoporosis. Nat Clin Pract Rheumatol, 2009, 5(3): 174.

[3] Faccio R, Takeshita S, Zallone A, et al. c-Fms and αvβ3 integrin collaborate during osteoclnst differentiation. J Clin Invest, 2003, 111: 749-758.

[4] Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, et al. RANK/ RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. Curr Rev Musculoskelet Med, 2009, 2(1): 56-64.

(下转第 211 页)

2205-2212.

[2] Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner, 1991, 15(3): 175-191.

[3] Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, et al. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. Bone, 1995, 17(4): 125-133.

[4] 王立童,詹红生.原发性骨质疏松动物模型的复制及其机制.亚太传统医药,2009, 5(8):178-180.

[5] Lee J, Vasikaran S. Current recommendations for laboratory testing and use of bone turnover markers in management of osteoporosis. Ann Lab Med, 2012, 32(2): 105-112.

[6] Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O. et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. Osteoporos Int, 2011, 22(2): 391-420

[7] Kim TH, Jung JW, Ha BG, et al. The effects of luteolin on osteoclast differentiation, function in vitro and ovariectomy-induced bone loss. J Nutr Biochem. 2011 Jan;22(1):8-15.

[8] Yoon KH, Cho DC, Yu SH, et al. The Change of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats : Analyses of MicroCT Scan and Biochemical Markers of Bone Turnover. J Korean Neurosurg Soc, 2012, 51(6):323-327.

[9] Yasumizu T, Okuno T, Fukada Y, et al. Age-related changes in bone mineral density and serum bone-related proteins in premenopausal and postmenopausal Japanese women. Endocr J, 2000, 47(2): 103-109.

[10] Claudon A, Vergnaud P, Valverde C, et al. New automated multiplex assay for bone turnover markers in osteoporosis. Clin Chem, 2008, 54(9): 1554-1563.

[11] Trouvin AP, Goëb V. Receptor activator of nuclear factor-κB ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. Clin Interv Aging, 2010, 19(5):345-354.

[12] Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, et al. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. Bone, 1999, 25(5): 525-534.

[13] Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli F, et al. Detection of osteoprotegerin (OPG) and its ligand (RANKL) mRNA and protein in femur and tibia of the rat. J Mol Histol, 2005, 36(1-2): 59-67.

[14] Tanaka H, Mine T, Ogasa H, et al. Expression of RANKL/OPG during bone remodeling in vivo. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 411(4):690-694.

[15] Eghbali-Fatourechi G, Khosla S, Sanyal A, et al. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. J Clin Invest, 2003, 111(8): 1221-1230.

(收稿日期:2012-08-23)

(上接第 250 页)

[5] Battaglino R, Kim D, Fu J, et al. c-myc is required for osteoclast differentiation. J Bone Miner Res, 2002, 17(5):763-773.

[6] Sasaki N, Kusano E. Bone and bone related biochemical examinations. Bone and collagen related metabolites. Measurement and clinical role of OPG. Clin Calcium, 2006, 16(6):956-962.

[7] Parfitt AM. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. Bone, 2002, 30(1):5-7.

[8] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan C, et al. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell, 1997, 89(2):309-319.

[9] Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, et al. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. Endocrinology, 2000, 141(12):4768-4776.

[10] Tsuda E, Goto M, Mochizuki SI, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. J Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, 234(1):137-142.

[11] Ann E. Kearns, Sundeep Khosla and Paul J. Kostenuik. Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. Endocrine Reviews, 2008, 299(2):155-192.

[12] 王信,汪洋,张健. RANK_RANKL 在假体松动中的分子机制研究与探讨[J]. 中国骨质疏松杂志, 2009, 15(9):680-684.
Wang X, Wang Y, Zhang J. Effects of RANK/RANKL signal activation on differentiation and apoptosis of osteoclast. Chin J Osteoporos, 2009, 15(9):680-684.

[13] 王信,汪洋,朱勇军,等. 诱导小鼠破骨前体细胞成熟分化的实验条件探讨[J]. 中国骨质疏松杂志, 2011, 17(3):190-194.
Wang X, Wang Y, Zhu Y J, et al. Study on experimental conditions of mouse osteoclast precursor cell differentiation. Chin J Osteoporos, 17(3):190-194.

(收稿日期:2012-08-17)

# 骨保护素体外抑制小鼠单核巨噬细胞成熟分化的实验研究



作者： 王信， 罗艳， 廖文波， WANG Xin， LUO Yan， LIAO Wenbo

作者单位： 王信,廖文波,WANG Xin,LIAO Wenbo(遵义医学院附属医院脊柱外科,遵义,563000)， 罗艳,LUO Yan(遵义医学院附属医院新生儿科)

刊名： 中国骨质疏松杂志ISTIC

英文刊名： Chinese Journal of Osteoporosis

年，卷(期)： 2013,19(3)

## 参考文献(13条)

1. 黄传兵 骨质疏松症的危险因素及防治 2003(03)

2. Deal C Potential new drug targets for osteoporosis 2009(03)

3. Faccio R;Takeshita S;Zallone A c-Fms and αvβ3 integrin collaborate during osteoclnst differentiation 2003

4. Wright HL;McCarthy HS;Middleton J RANK/ RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease 2009(01)

5. Battaglino R;Kim D;Fu J c-myc is required for osteoclast differentiation 2002(05)

6. Sasaki N;Kusano E Bone and bone related biochemical examinations.Bone and collagen related metabolites.Measurement and clinical role of OPG 2006(06)

7. Parfitt AM Targeted and nontargeted bone remodeling:relationship to basic multicellular unit origination and progression 2002(01)

8. Simonet WS;Lacey DL;Dunstan C Osteoprotegerin:A novel secreted protein involved in the regulation of bone density 1997(02)

9. Gori F;Hofbauer LC;Dunstan CR The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated 2000(12)

10. Tsuda E;Goto M;M ochizuki SI Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis 1997(01)

11. Ann E.Kearns;Sundeep Khosla;Paul J.Kostenuik Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease 2008(02)

12. 王信;汪洋;张健 RANK_RANKL在假体松动中的分子机制研究与探讨 2009(09)

13. 王信;汪洋;朱勇军 诱导小鼠破骨前体细胞成熟分化的实验条件探讨 2011(03)