

CTGF 对破骨前体细胞 RAW264.7 增殖及碳酸酐酶 II 分化的影响

张丽¹ 姜丽燕² 张良岩² 孙彩霞² 栾炳国² 陆诗清² 隋国良^{2*}

1. 山东省青岛市莱西市人民医院内二科 266600

2. 山东省烟台市烟台山医院内分泌科 264001

中图分类号: R363 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 02-0133-04

摘要: **目的** 研究结缔组织生长因子(CTGF)对体外培养的破骨细胞前体细胞 RAW264.7 增殖及对核因子 Kappa B 配体受体(RANKL)诱导体外培养的破骨细胞前体细胞 RAW264.7 分化为成熟多核破骨细胞的影响。**方法** 使用 200 ng/mL CTGF 干预培养的破骨细胞前体细胞 RAW264.7, 采用³H-TdR 掺入法检测 RAW264.7 细胞增殖率; 使用 200 ng/mL CTGF 与 RANKL 单独或共同处理 RAW264.7 细胞, 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色观察 TRAP 阳性多核细胞, Western blot 检测碳酸酐酶 II 蛋白的表达。**结果** CTGF 可显著促进 RAW264.7 细胞增殖; 200 ng/mL CTGF 与 RANKL 共同处理 RAW264.7 细胞可促进 RAW264.7 细胞分化为成熟多核破骨细胞; 200 ng/mL CTGF 与 RANKL 共同处理 RAW264.7 细胞可促进 RAW264.7 细胞碳酸酐酶 II 蛋白的表达。**结论** CTGF 促进体外培养的破骨细胞前体细胞 RAW264.7 增殖, 促进 RANKL 诱导的破骨细胞前体细胞 RAW264.7 分化为成熟多核破骨细胞。

关键词: 破骨细胞; 结缔组织生长因子

Effect of CTGF on carbonic anhydrase II and the proliferation and the differentiation of RAW264.7 cells

ZHANG Li¹, JIANG Liyan², ZHANG Liangyan², ZHANG Caixia², LUAN Bingguo², LU Shiqing², SUI Guoliang²

1. Second Internal Department, People's Hospital of Laixi, Qingdao Shandong Province 266600, China

2. Department of Endocrinology, Yantaishan Hospital, Yantai 264001, China

Corresponding author: SUI Guoliang, Email: glsui@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of CTGF on the proliferation of cultured RAW264.7 cells and the differentiation of mature multinuclear osteoclasts induced by RANKL. **Methods** RAW264.7 cells were cultured with the intervention of 200ng/ml CTGF. The cell proliferation rate was detected using (³H)-thymidine (³H-TdR) incorporation method. After the intervention with or without RANKL, TRAP staining was performed to observe TRAP-positive multinuclear cells (MNCs). The expression of carbonic anhydrase II was detected using Western blotting. **Results** CTGF could significantly promote the proliferation of RAW264.7 cells. The intervention of 200ng/ml CTGF combined with RANKL could promote RAW264.7 cell differentiation into mature multinuclear osteoclasts. It also could promote the expression of carbonic anhydrase II in RAW264.7 cells. **Conclusion** CTGF can promote the proliferation of cultured RAW264.7 cells and promote its differentiation into mature multinuclear osteoclasts induced by RANKL.

Key words: Osteoclast; CTGF

RAW264.7 细胞是一种较好的破骨细胞前体细胞模型, 该细胞系处于由造血干细胞(hemopoietic stem cell, HSC)分化为成熟破骨细胞(osteoclast,

OC)过程中的相对晚期阶段, 诱导成熟 OC 所需的条件是核因子 Kappa B 配体受体(receptor activator of nuclear kappa B ligand, RANKL), 用该法可获得大量的成熟 OC。研究表明, 17β-雌二醇($10^{-6} \sim 10^{-8}$ mmol/L)可下调成骨细胞(osteoblast, OB)结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,

基金项目: 烟台市科技发展计划(2009236)

* 通讯作者: 隋国良, Email: glsui@qq.com

CTGF) 表达, 而 CTGF 参与 OB 的增殖、分化, 可能亦与骨质疏松症有关^[1,2]。但 CTGF 对破骨细胞增殖、分化的影响目前尚未见报道。本实验使用重组人结缔组织生长因子 (recombinant human connective tissue growth factor, rCTGF) 含人成熟结缔组织生长因子 C-末端的自 Met₂₅₃ ~ Ala₃₄₉ 氨基酸序列, 共 98 氨基酸 (rCTGF₂₅₃₋₃₄₉), 不含成熟 CTGF 的胰岛素生长因子结合区、VW (von Willebrand) 因子 C 重复序列及血小板反应蛋白 (thrombospondin, TSP) 重复区, 具有人 CTGF 的与肝素结合、促进粘附、促分裂等生物学活性。重组 CTGF 干预体外培养的破骨前体细胞 RAW264.7, 观察 CTGF 对破骨前体细胞 RAW264.7 增殖及对 RANKL 诱导体外培养的破骨细胞前体细胞 RAW264.7 分化为成熟多核破骨细胞的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

仪器: 细胞培养箱, 超净台: Forma Scientific 公司, Marietta, Ohio, USA; 高速低温离心机: Beckman 公司, Paloalto, CA, USA; 紫外/可见分光光度仪: Peckman Elmer 公司, CT, USA; Nikon300 型自动摄影倒置显微镜: Nikon 公司, Tpkyo, Japan。

试剂: 重组人 CTGF (含人成熟 CTGF C 末端的自 Met₂₅₃ ~ Ala₃₄₉ 氨基酸序列, 共 98 氨基酸 rCTGF₂₅₃₋₃₄₉) 购自 peprotech 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Pierce 公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; 羊抗碳酐酶 II 的抗体、猴抗羊二抗及化学发光法显影试剂自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 小鼠的单核细胞系 RAW264.7 细胞用含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的无酚红 DMEM 培养液培养, 其中含 50 U/mL 青霉素和 50 μ g/mL 庆大霉素。2 d 换液 1 次, 细胞汇片后, 用胰酶 EDTA 消化液消化细胞, 根据不同的实验目的接种于不同规格的培养板上。

1.2.2 rCTGF 对 RAW264.7 细胞增殖的影响: RAW264.7 细胞接种于 24 孔培养板, 10% FBS 无酚红 DMEM 培养液培养 2d, 于第 3 天换 0.1% BSA 无酚红 MEM 培养液培养 24h 后, 用不同浓度的 rCTGF (0、50、100、200、1000 ng/mL) 干预 16h 后, 加入 ³H-TdR 1 μ Ci/孔, 继续培养 8h 后, 吸走培养液, 加入 2 mL 预冷的 10% 三氯乙酸 10 min, 10% 三氯乙酸反复洗涤 3 次。每孔加入 0.3 mol/L NaOH SDS 液 0.5

mL, 60°C, 30 min。收集细胞裂解液, 加入 3 mL 闪烁液, 液闪仪测定每孔 cpm 值。

1.2.3 rCTGF 对 RANKL 诱导的破骨细胞的影响: RAW 264.7 细胞以 1×10^4 /孔接种于 6 孔板, 培养过夜后分别用 50 ng/mL RANKL 和 CTGF (200 ng/mL) 干预, 细胞每 2d 换液 1 次。第 6 天 TRAP 染色, 细胞用柠檬酸盐/丙酮溶液固定 30min, 在以蔡酚 AS-BI 磷酸盐作为底物的孵育液中 37°C 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 封固, 光镜观察。显微镜下计数 TRAP 阳性多核 OC (≥ 3 个核)。

1.2.4 rCTGF 与 RANKL 共干预对 RAW264.7 细胞碳酐酶 II 表达的影响: 用细胞裂解液 (150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris, pH 7.5, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L NaVO₄, 2 mmol/L EGTA, 50 μ g/mL leupeptin) 冰上孵育裂解细胞 20 min, 将匀浆于 10000 r/min, 4°C 离心 5 min。BCA 蛋白定量试剂盒定量后, 各取 50 μ g 蛋白于 10% SDS-PAGE 电泳, 转膜至 PVDF 膜, 含 5% 脱脂奶的 PBST (含 0.01% 吐温-20 的磷酸缓冲液) 封闭液室温下振荡 2 h, 抗碳酐酶 II 的抗体 (1:1000) 孵育 3 h, 含辣根过氧化物酶标记二抗 (1:5000) 孵育 1 h, PBST 室温下漂洗 15 min 后, 化学发光法显影。

1.3 统计学处理

各实验独立重复 3 次, 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用方差分析。显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 rCTGF 对体外培养的 RAW264.7 细胞增殖的影响

与空白对照组相比, 50 ~ 1000 ng/mL rCTGF 干预使 ³H-TdR 掺入量明显增加, rCTGF 的浓度为 200 ng/mL 达最大效用 (图 1)。

2.2 CTGF 促进 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞

200 ng/mL 浓度 CTGF 能显著促进 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞分化为成熟 OC 数量 (图 2)。

2.3 CTGF 对 RAW264.7 细胞碳酐酶 II 蛋白表达的影响

与 RANKL 对照组相比, CTGF (200 ng/mL) 与 RANKL 合用显著促进 RAW264.7 细胞碳酐酶 II 蛋白的表达 ($P < 0.05$) (图 3)。

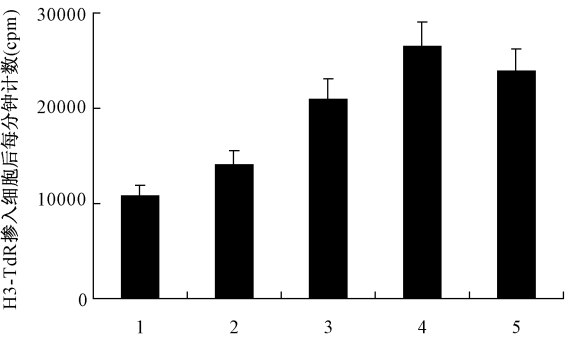


图 1 不同浓度 rCTGF 干预 48h 对 RAW264. 7 细胞增殖的影响
注:1 对照组,2 ~5 分别为 50、100、200、1000 ng/mL 干预组与对照组相比, * $P < 0. 01$

Fig. 1 Effect of different concentrations of rCTGF on the proliferation of RAW264. 7 cells after 48-hour intervention

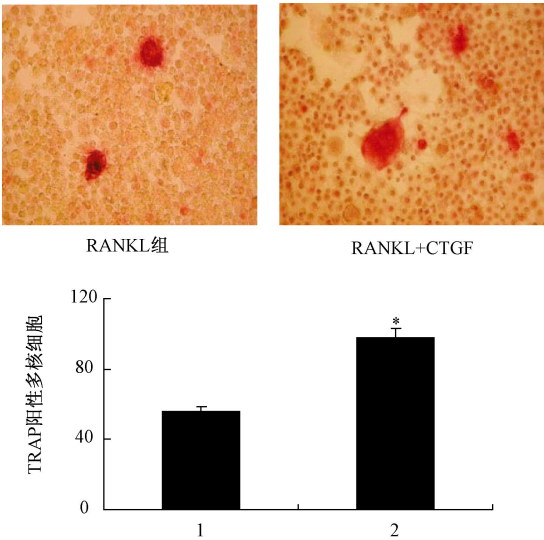


图 2 rCTGF 对 RANKL 诱导 RAW264. 7 细胞分化为破骨细胞的影响
注: 1 RANKL 对照组,2 为 200 ng/mLCTGF + RANKL 干预组,与单独的 RANKL 组相比, * $P < 0. 01$

Fig. 2 Effect of rCTGF on the differentiation of RAW264. 7 cells into osteoclasts induced by RANKL

3 讨论

3.1 正常成熟骨的代谢

正常成熟骨的代谢主要以骨重建形式进行,在全身激素、局部细胞因子和其他细胞调节因子的协同作用下,骨组织不断吸收旧骨,生成新骨,骨吸收和骨形成保持相对稳定状态。

骨吸收主要由 OC 介导,活化的 OC 分泌某些酶

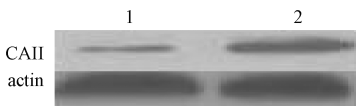


图 3 200 ng/mL rCTGF 干预 72 h 对 RANKL 诱导的 RAW264. 7 细胞碳酐酶 II 蛋白蛋白表达的影响
注:1 RANKL 对照组,2 为 200 ng/ml CTGF + RANKL 干预组

Fig. 3 Effect of 200 ng/mL rCTGF on the expression of carbonic anhydrase II in RAW264. 7 cells induced by RANKL after 72-hour intervention

和细胞因子溶解骨基质的胶原纤维,矿物质被游离。在绝经后骨质疏松症及各种炎症性骨吸收中,过量表达的细胞因子如 TNF- α 可通过抑制骨前体细胞向 OB 分化,诱导 OB 凋亡,从而抑制 OB 的功能,参与骨质疏松症的发生、发展。OC 产生增多、活性增强导致骨吸收大于骨形成,骨基质降解明显大于形成,骨转换增加,导致骨量丢失和骨质量下降。OC 在骨发育、骨形成、骨吸收和骨量的调节方面起着关键作用。OC 起源于 HSC 或骨髓始祖细胞,HSC 分裂为多能单核细胞/巨噬细胞谱系细胞的前体细胞后,受多种细胞因子的直接或间接刺激作用,经增殖、分化与融合后,形成多核的成熟 OC,最后被活化成为具有骨吸收功能的 OC^[3-7]。组织蛋白酶 K、CA II 等与成熟 OC 骨吸收功能有关。组织蛋白酶 K 和 CA II 的表达是其最终发挥骨吸收功能必备的物质条件。

3.2 重组人 CTCF 可促进小鼠破骨前体细胞 RAW264. 7 增殖与分化

以往的研究发现,CTGF 可抑制成骨细胞 RANKL 的表达^[8],提示 CTGF 可通过抑制成骨细胞 RANKL 的表达,可能具有间接抑制 OC 活化的作用。但 CTGF 对 OC 形成直接效应,目前研究较少。Nozawa 等^[9] 研究发现活动性类风湿性关节炎病人血清 CTGF 水平显著升高,CTGF 与 M-CSF、RANKL 协同作用促进外周血单核细胞分化形成 OC,抗 CTGF 抗体可抑制 CTGF 与 M-CSF、RANKL 协同促进外周血单核细胞分化为 OC 的作用。本研究使用的重组人 CTCF 含有人结缔组织生长因子 C-末端 98 氨基酸残基(自 Met253 ~ Ala349 氨基酸序列,分子量 11.2 kDa),具有与全长 CTGF 相同的生物学效应如与肝素结合、促进粘附、促分裂等;并发现重组人 CTCF 可促进小鼠破骨前体细胞 RAW264. 7 增

殖;200 ng/mL CTGF 与 RANKL 联合干预小鼠破骨前体细胞 RAW264.7 较单用 RANKL 可显著增加 RAW264.7 细胞分化为成熟 OC 的数量;此外,200 ng/mLCTGF 与 RANKL 联合干预小鼠破骨前体细胞 RAW264.7 较单用 RANKL 可显著增加 OC 功能基因碳酞酶 II 的表达,这说明 CTGF 可能具有促进 OC 介导骨吸收的作用。雌二醇可抑制人成骨细胞 CTGF 的表达,本研究提示 CTGF 可能参与介导雌二醇抑制 OC 介导骨吸收的作用。

CTGF 可促进破骨前体细胞 RAW264.7 增殖,协同增加 RANKL 诱导 OC 形成,并增加 OC 功能基因碳酞酶 II 的表达,说明 CTGF 对维持骨代谢平衡具有重要作用。

【 参 考 文 献 】

[1] 隋国良,彭依群,翟木绪,等. 17β-雌二醇下调人成骨细胞 CTGF 表达的信号转导机制研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2006,12(5):443-446.
Sui GL, Peng YQ, Zhai MX, et al. The mechanisms involved in the inhibitory effect of 17β - estradiol on connective tissue growth factor in human osteoblasts[J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2006,12(5):443-446. (in Chinese)
[2] 隋国良,彭依群,何玉玲,等. 重组结缔组织生长因子对人成骨细胞增殖分化和凋亡的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2008,24(4)360-363.
Sui GL, Peng YQ, He YL, et al. The effects of recombinant human connective tissue growth factor on the proliferation, differentiation, and apoptosis in human osteoblasts[J]. Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism, 2008, 24(4) 360-363. (in Chinese)

[3] Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, et al. Oringin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1990,87(18):7260-7264.
[4] Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science,2000, 289(5484):1504-1508.
[5] Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph node organogenesis[J]. Nature,1999,397(6717):315-323.
[6] Quinn JM, Neale S, Fujikawa Y, et al. Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells[J]. Calcif Tissue Int,1998,62(6):527-531.
[7] Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1999,30,96(7):3540-3545.
[8] 隋国良,彭依群,何玉玲,等. 重组结缔组织生长因子对人成骨细胞骨保护素/RANKL 表达的影响[J]. 中华内分泌代谢杂志,2010,26(10):881-884.
Sui GL, Peng YQ, He YL et al. The Effects of recombinant human connective tissue growth factor on the expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) and the mechanisms involved in human osteoblasts [J]. Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism,2010,26 (10):881-884. (in Chinese)
[9] Nozawa K, Fujishiro M, Kawasaki M, et al. Connective tissue growth factor promotes articular damage by increased osteoclastogenesis in patients with rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther,2009,11(6):R174.

(收稿日期: 2013-01-16;修回日期:2013-04-07)

CTGF 对破骨前体细胞 RAW264. 7增殖及碳酸酐酶 II 分化的影响

作者：[张丽](#)，[姜丽燕](#)，[张良岩](#)，[孙彩霞](#)，[栾炳国](#)，[陆诗清](#)，[隋国良](#)，[ZHANG Li](#)，[JIANG Liyan](#)，[ZHANG Liangyan](#)，[ZHANG Caixia](#)，[LUAN Bingguo](#)，[LU Shiqing](#)，[SUI Guoliang](#)

作者单位：[张丽, ZHANG Li \(山东省青岛市莱西市人民医院内二科 266600\)](#)，[姜丽燕, 张良岩, 孙彩霞, 栾炳国, 陆诗清, 隋国良, JIANG Liyan, ZHANG Liangyan, ZHANG Caixia, LUAN Bingguo, LU Shiqing, SUI Guoliang \(山东省烟台市烟台山医院内分泌科 264001\)](#)

刊名：[中国骨质疏松杂志](#) 

英文刊名：[Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年，卷(期)：2014(2)

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201402005.aspx