

· 论著 ·

TNF- α 及 TNF- α 抗体对破骨细胞 V-ATP 酶的影响王潇¹ 陈健^{1*} 张鑫¹ 何剑全² 黄慧²

1. 厦门大学医学院, 福建 厦门 361000

2. 厦门大学附属中山医院康复科, 福建 厦门 361000

中图分类号: R34 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 09-1132-04

摘要: **目的** 研究不同浓度的 TNF- α 及 TNF- α 抗体对破骨细胞上 V-ATP 酶表达量的影响。**方法** 体外诱导小鼠 RAW264.7 细胞分化为破骨细胞,通过抗酒石酸性磷酸酶染色检测破骨细胞生成情况。然后将破骨细胞分为对照组、TNF- α 干预组及 TNF- α 抗体干预组, TNF- α 干预组、TNF- α 抗体干预组分别用低、中、高三种浓度的 TNF- α 、TNF- α 抗体干预 48 h。用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time PCR)、Western blot 检测破骨细胞 V-ATP 酶的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** TRAP 染色检测提示有多核破骨细胞生成。TNF- α 处理组 V-ATP 酶 mRNA 表达水平显著高于对照组($P < 0.001$); TNF- α 抗体处理组 V-ATP 酶 mRNA 表达水平显著低于对照组($P < 0.001$)。同时, TNF- α 处理组 V-ATP 酶蛋白表达水平显著高于对照组($P < 0.05$); TNF- α 抗体处理组 V-ATP 酶蛋白表达水平显著低于对照组($P < 0.05$)。**结论** TNF- α 可提高破骨细胞 V-ATP 酶的表达; TNF- α 抗体可抑制破骨细胞 V-ATP 酶的表达。上述提示 TNF- α 可能通过提高破骨细胞 V-ATP 酶的表达从而增加破骨细胞的骨吸收作用。

关键词: RAW264.7 细胞; 破骨细胞; 肿瘤坏死因子 α ; 肿瘤坏死因子 α 抗体; V-ATP 酶

Effect of TNF-alpha and TNF-alpha antibody on the V-ATPase expression in osteoclasts.WANG Xiao¹, CHEN Jian^{2*}, ZHANG Xin¹, HE Jianquan², HUANG Hui²

1. Medical College of Xiamen University, Xiamen 361000, China

2. Department of Rehabilitation, Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361000, China

* Corresponding author: CHEN Jian, Email: chenjian5@medmail.com.cn

Abstract: **Objective** To explore the effect of different concentrations of TNF-alpha and TNF-alpha antibody on the V-ATPase expression in osteoclasts. **Methods** Mouse RAW264.7 cells were induced into osteoclasts in vitro. The osteoclastogenesis was detected with tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) staining. The osteoclasts were divided into control group, TNF-alpha intervention group, and TNF-alpha antibody intervention group. TNF-alpha antibody intervention group was treated with different concentrations of TNF-alpha antibody for 48 h. The mRNA and the protein expression levels of V-ATPase in osteoclasts were examined using real-time PCR and Western blotting analysis. **Results** The formation multinucleated osteoclasts were proved with TRAP staining. The mRNA expression level of V-ATPase in TNF-alpha treatment group were significantly higher than that in the control group ($P < 0.001$). The mRNA expression level of V-ATPase in TNF-alpha antibody treatment group were significantly lower than that in the control group ($P < 0.001$). The protein expression levels of V-ATPase in TNF-alpha treatment group were significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). The protein expression level of V-ATPase in TNF-alpha antibody treatment group were significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** TNF-alpha improves the expression of V-ATPase in osteoclasts. TNF-alpha antibody reduces the expression of V-ATPase in osteoclasts. These suggest that TNF-alpha improves osteoclastic bone absorption by increase the expression of V-ATPase.

Key words: RAW264.7 cell; osteoclast; TNF-alpha; TNF-alpha antibody; V-ATPase

破骨细胞作为体内唯一的骨再吸收细胞,它通

过与骨表面之间形成微环境来降低骨基质的成分^[1],所以破骨细胞是骨质疏松和骨折预防和治疗方面的重要靶点。研究表明,在骨吸收的过程中,附着于骨骼表面的破骨细胞在酸性的条件下先溶解骨

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81272168);福建省自然科学基金资助项目(2016J01623)

* 通信作者: 陈健, Email: chenjian5@medmail.com.cn

矿物质,继而降解骨基质成分。在此过程中,V-ATP 酶的表达对骨吸收所必需的酸性微环境起到了至关重要的作用^[2,3]。肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 对破骨细胞 V-ATP 酶表达的影响尚不十分明确。本实验通过观察 TNF- α 及 TNF- α 抗体对破骨细胞 V-ATP 酶的影响,来探讨 TNF- α 提高破骨细胞的骨吸收活性的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小鼠单核巨噬细胞株 RAW264.7 购于上海傅衡生物科技有限公司,核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) (PeropTech, USA), TNF- α (PeropTech, USA), TNF- α 抗体 (abcam), 胰蛋白酶 (GIBCO), 双抗 (HyClone), 胎牛血清 (Biological Industries), DMEM 培养基 (GIBCO), 抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 染色试剂盒 (Sigma), TRIZOL (ambion), RNA 逆转录试剂盒 (PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser) (TaKaRa), 荧光定量 PCR 试剂 (TaKaRa), V-ATP 酶抗体 (GenScript), 引物 (上海生工), PCR 扩增仪 (普通 mycycler) (BIO-RAD, 美国), ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI), FluorChem HD2 成像系统 (美国 Protein simple)。

1.2 破骨细胞的诱导及鉴定

将 RAW264.7 细胞接种于 6 cm 培养皿中,加入完全培养液 (含 10% 的胎牛血清及 1% 的双抗),置入培养箱内培养 (温度为 37 °C, CO₂ 的体积分数为 5%)。24 小时待细胞贴壁后,加入 50 ng/mL 的 RANKL 诱导因子。隔日换液 1 次,并保持 RANKL 的终浓度为 50 ng/mL。每天在倒置相差显微镜下观察细胞的生长及分化情况。培养 6 天后做 TRAP 染色鉴定。按照 TRAP 染色试剂盒配置固定液和染色液。PBS 洗 1 次,加固定液固定 30 s,用去离子水彻底冲洗,再加 TRAP 染色液,置入 37 °C 恒温箱避光孵育 1 h,在倒置显微镜下观察并拍片。

1.3 实验分组

细胞分为对照组, TNF- α 干预组和 TNF- α 抗体干预组。均用 50 ng/mL 的 RANKL 诱导 8 天,其中 TNF- α 干预组在 RANKL 诱导 6 天后分别用低浓度 (20 ng/mL)、中浓度 (50 ng/mL)、高浓度 (80 ng/mL) 的 TNF- α 干预 48 h; TNF- α 抗体干预组在 RANKL 诱导 6 天后分别用低浓度 (20 ng/mL)、中浓度 (50 ng/mL)、高浓度 (80 ng/mL) 的 TNF- α 抗体干预

48 h。

1.4 V-ATP 酶基因和蛋白表达检测

实时荧光定量聚合酶链反应 (realtime fluorescence quantitative polymerase chain reaction, real-time PCR) 检测 mRNA 表达: Trizol 提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 逆转录设定的反应条件为: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 结束。在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上进行实时检测, 所用引物见表 1。实时荧光定量 PCR 采用 20 μ L 反应体系, 包含前后引物各 0.8 μ L, 10 μ L SYBR[®] Premix Ex Taq II, 0.4 μ L ROX Reference Dye II, 6 μ L 无酶水与 2 μ L 的 cDNA。反应条件为: 95 °C 30 s, 然后 95 °C 5 s, 60 °C 34 s 四十个循环。采用 2- $\Delta\Delta$ Ct 法分析结果。

表 1 real-time PCR 所用目的基因及引物

Table 1 Primers of genes used in real-time PCR

Primer 名称	序列	Product Size (bp)
V-ATP 酶	上游: 5'-CCGTGTCAATTTTGGAAACA-3'	109
	下游: 5'-GTGCAGTGTGAGACCTTGA-3'	
GAPDH	上游: 5'-TGGTCCAGGTTTCTTACTCC-3'	183
	下游: 5'-GGTGTCTCTCGGACTTCA-3'	

Western blot 检测蛋白质表达: 用 RIPA 缓冲液提取破骨细胞的总蛋白, 煮沸变性 10 分钟, 进行凝胶电泳后转膜。然后与 V-ATP 酶兔抗鼠单克隆一抗 4 °C 孵育过夜, GAPDH 作为内参。羊抗兔 IgG 二抗孵育 1 h。用 Image J 分析软件检测膜上每个条带的相对灰度值, 测出各组蛋白相对表达量。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据的统计分析采用单因素方差分析 (ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 破骨细胞检测

接种 24 h 后, 细胞开始逐渐贴壁, 体积较小, 均匀一致。在 50 ng/mL 的 RANKL 的诱导下, 6 天后可见很多体积较大的多核细胞, 呈圆形、梭形或不规则形状。TRAP 染色呈阳性 (图 1), 细胞内含有多个细胞核, 细胞质内可见大小不等的空泡。

2.2 real-time PCR 检测 V-ATP 酶 mRNA 的表达

破骨细胞分别与 TNF- α 及 TNF- α 抗体经过 48 h 共培养后, 对照组、不同浓度 TNF- α 干预组及不同浓度 TNF- α 抗体干预组 V-ATP 酶的 mRNA 相对表达量见图 2、图 3。低、中、高浓度 TNF- α 干预组 V-ATP 酶的 mRNA 表达量显著高于对照组 ($P <$

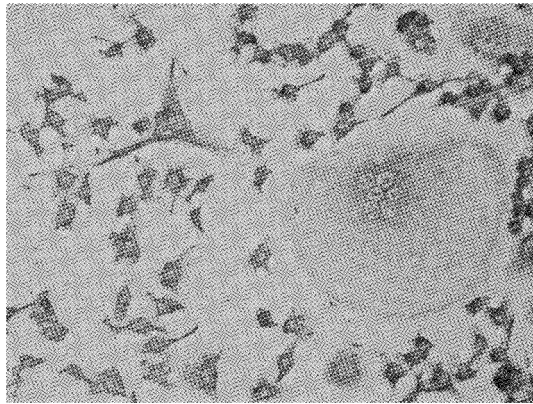


图 1 倒置相差显微镜下破骨细胞 TRAP 染色 × 40

Fig. 1 Inverted phase contrast microscopic appearance of some typical rat osteoclast cells stained with TRAP (×40)

0.000 1);低、中、高浓度 TNF- α 抗体干预组 V-ATP 酶的 mRNA 表达量显著低于对照组 ($P < 0.000 1$)。该结果提示 TNF- α 能够显著提高 V-ATP 酶的 mRNA 表达;TNF- α 抗体能够显著降低 V-ATP 酶的 mRNA 表达。

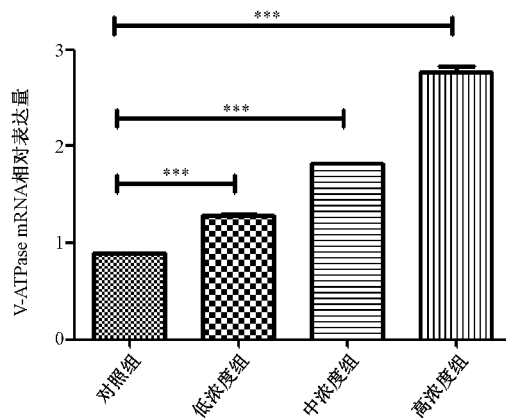


图 2 不同浓度 TNF- α 对 V-ATP 酶 mRNA 表达量的影响 (***) $P < 0.000 1$

Fig. 2 Effect of different concentrations of TNF- α on the mRNA expression of V-ATPase

2.3 Western-blot 检测 V-ATP 酶蛋白的表达

破骨细胞分别与 TNF- α 及 TNF- α 抗体经过 48 h 共培养后,对照组、不同浓度 TNF- α 干预组及不同浓度 TNF- α 抗体干预组 V-ATP 酶的蛋白表达见图 4、图 5。TNF- α 干预组 V-ATP 酶蛋白表达量明显高于对照组 ($P < 0.05$);TNF- α 抗体干预组 V-ATP 酶的蛋白表达量明显低于对照组 ($P < 0.05$)。该结果提示 TNF- α 能够显著提高 V-ATP 酶的蛋白表达;TNF- α 抗体能够显著抑制 V-ATP 酶的蛋白表达。

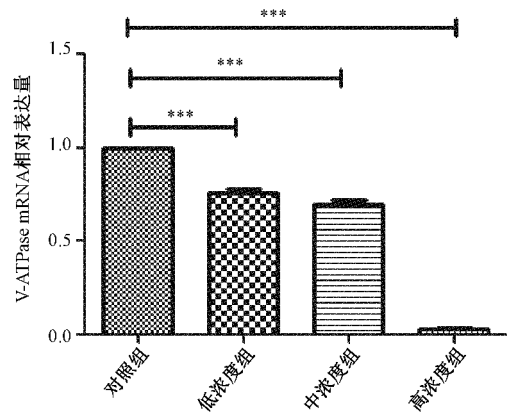


图 3 不同浓度 TNF- α 抗体对 V-ATP 酶 mRNA 表达量的影响 (***) $P < 0.000 1$

Fig. 3 Effect of different concentrations of TNF- α antibody on the mRNA expression of V-ATPase

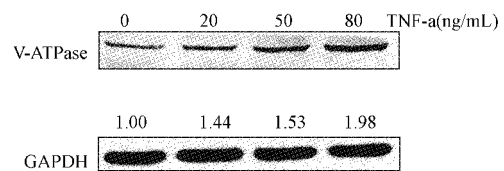


图 4 不同浓度 TNF- α 对破骨细胞 V-ATP 酶蛋白表达量的影响

Fig. 4 Effect of different concentrations of TNF- α on the protein expression of V-ATPase

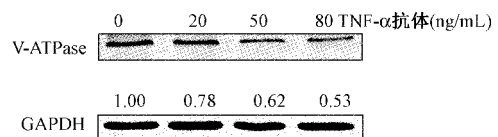


图 5 不同浓度 TNF- α 抗体对破骨细胞 V-ATP 酶蛋白表达量的影响

Fig. 5 Effect of different concentrations of TNF- α antibody on the protein expression of V-ATPase

3 讨论

TNF- α 是参与骨骼重塑的几种炎性细胞因子之一,它可以由正常的破骨细胞合成,主要作用是通过促进破骨细胞形成和抑制成骨细胞的功能而维持骨代谢的稳态^[5]。TNF- α 作为 TNF 家族重要成员之一,可以刺激成骨细胞产生粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IL6 等因子,诱导破骨细胞前体细胞分化为破骨细胞。也可以影响成骨细胞骨保

护素(OPG)和RANKL的基因表达,从而调控破骨细胞的分化和活化^[6]。研究表明,TNF- α 不仅可以促进巨噬细胞或骨髓基质干细胞分化为破骨细胞,而且也可以提高破骨细胞的骨吸收活性^[4]。

V-ATP酶是一种高度表达于破骨细胞膜上的特殊蛋白质,对控制细胞内的pH值的生理过程起着重要的作用,所以,其表达量对破骨细胞性骨吸收起着至关重要的作用^[2,3]。V-ATP酶的核心结构由V1和V0两个不同的结构域及辅助亚基AC45和M8-9组成^[7]。V1部分位于细胞质内,是一个570 ku的复杂结构域,由(A,B,C,D,E,F,G和H)8个不同的亚基构成,主要负责ATP的水解^[8,9]。V0部分则位于跨膜区,是一个260 ku的复合体,由(a,d,e,c,c',c'')6个不同的亚基组成,主要负责质子的转移^[10]。在骨吸收的过程中,破骨细胞先贴附于骨表面,形成相对隔绝的细胞外骨吸收微环境,然后在酸性条件下溶解骨矿物质,继而降解骨基质成分^[11]。研究发现,V-ATP酶以高密度在特定的细胞膜中表达,如肾闰细胞和破骨细胞等,它们在尿液酸化、破骨细胞的骨吸收中发挥着重要的作用^[12]。破骨细胞分泌氢离子溶解羟基磷灰石晶体是骨骼脱钙的重要环节,其中,破骨细胞膜上的V-ATP酶参与氢离子分泌这一关键生理过程^[7,13]。研究表明,V-ATP酶缺陷是患骨硬化病的常见原因^[14]。本研究观察TNF- α 对破骨细胞上V-ATP酶表达量的影响,可以了解TNF- α 对提高破骨细胞骨吸收活性的机制。

破骨细胞作为终末细胞不能增殖和传代,以往获得破骨细胞的方法是提取鼠骨髓基质干细胞,然后诱导分化得到破骨细胞,这种方法难以获取大量高纯度破骨细胞。故本实验选用诱导破骨细胞前体细胞RAW264.7向破骨细胞分化。结果显示,50 ng/mL RANKL诱导RAW264.7细胞,6天后可获得大量成熟的破骨细胞,且TRAP染色呈阳性。

V-ATP酶在破骨细胞中表达量的增加可导致破骨细胞骨吸收活性的提高。本研究表明不同浓度的TNF- α 作用于破骨细胞后,低、中、高浓度组破骨细胞上V-ATP酶mRNA的表达量显著高于对照组,且呈一定的剂量依赖性;同时,TNF- α 干预组破骨细胞上V-ATP酶的蛋白表达量也显著高于对照组。此外,本研究还用不同浓度TNF- α 抗体来干预破骨细胞,观察破骨细胞上V-ATP酶mRNA和蛋白的表达,结果表明TNF- α 抗体可抑制破骨细胞上V-ATP酶mRNA和蛋白的表达,且呈一定的剂量依赖性。

由此推测TNF- α 作为一个炎症递质参与骨吸收的过程中,除了促进破骨细胞形成以外,其可能还通过增加破骨细胞上V-ATP酶的表达,从而增强破骨细胞的骨吸收活性。

【参 考 文 献】

- [1] Teitelbaum SL. The osteoclast and its unique cytoskeleton. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, 1240:14-17.
- [2] Kartner N, Manolson MF. Novel techniques in the development of osteoporosis drug therapy: the osteoclast ruffled-border vacuolar H(+)-ATPase as an emerging target[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2014, 9(5):505-522.
- [3] Xiao YT, Xiang LX, Shao JZ. Vacuolar H(+)-ATPase[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(10):2002-2006.
- [4] Yang CR, Lai CC. Thiazolidinediones inhibit TNF-alpha-mediated osteoclast differentiation of RAW264.7 macrophages and mouse bone marrow cells through downregulation of NFATc1. *Shock*, 2010, 33(6):662-667.
- [5] Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(9):745-756.
- [6] Feng X. Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts[J]. *Gene*, 2005, 350(1):1-13.
- [7] Xu J, Cheng T, Feng HT, et al. Structure and function of V-ATPases in osteoclasts: potential therapeutic targets for the treatment of osteolysis[J]. *Histol Histopathol*, 2007, 22(4):443-454.
- [8] Drory O, Nelson N. The emerging structure of vacuolar ATPases[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2006, 21:317-325.
- [9] Thudium CS, Jensen VK, Karsdal MA, et al. Disruption of the V-ATPase functionality as a way to uncouple bone formation and resorption-a novel target for treatment of osteoporosis[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2012, 13(2):141-151.
- [10] Nishi T, Kawasaki-Nishi S, Forgacs M. Expression and function of the mouse V-ATPase d subunit isoforms[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(47):46396-46402.
- [11] Lee SH, Rho J, Jeong D, et al. v-ATPase V0 subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation[J]. *Nat Med*, 2006, 12(12):1403-1409.
- [12] Su Y, Zhou A, Al-Lamki RS, et al. The a-subunit of the V-type H+-ATPase interacts with phosphofructokinase - 1 in humans[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(22):20013-20018.
- [13] Qin A, Cheng TS, Pavlos NJ, et al. V-ATPases in osteoclasts: structure, function and potential inhibitors of bone resorption[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(9):1422-1435.
- [14] Supancharit C, Kornak U. Ion channels and transporters in osteoclasts[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 473(2):161-165.

(收稿日期:2017-09-18;修回日期:2018-03-21)