

本文引文格式:杨一秋,李兰,解继胜.破骨细胞建模方法的探索[J].
右江民族医学院学报,2021,43(3):306-309.

【论著与临床报道】

破骨细胞建模方法的探索

杨一秋¹,李兰¹,解继胜²

- (1. 右江民族医学院研究生学院,广西 百色 533000;
2. 右江民族医学院基础医学院组织胚胎学教研室,广西 百色 533000)

摘要:目的 探索 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化的最佳条件,为后续的实验研究提供一个可靠的破骨细胞建模方式。方法 将 RAW264.7 细胞以每孔 2×10^4 个、每孔 3×10^3 个分别接种到 6 孔板、24 孔板中,待贴壁 24 h 后更换为含 20 ng/ml 的巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、50 ng/ml 的核因子 κ B 受体活化因子配体(RANKL)的诱导液诱导培养,每隔 2 d 换液一次,待镜下观察到较多破骨细胞时进行抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色并利用实时荧光定量 PCR 检测活化 T-细胞核因子 1(NFATc1)、TRAP、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)的 mRNA 表达水平。结果 经过诱导培养 3 d 时破骨细胞开始聚集生长,出现多个核,但整体阳性破骨细胞不是太多,待诱导至 4~6 d 时,可见到较大面积的破骨细胞,细胞核增多达数十个,细胞质也非常丰富;与对照组相比,诱导组 NFATc1、TRAP、MMP-9 的 mRNA 表达水平上调。NFATc1、MMP-9 与对照组的差异有统计学意义($P < 0.05$),但是 TRAP 与对照组的差异没有统计学意义。结论 RAW264.7 细胞在 20 ng/ml 的 M-CSF、50 ng/ml 的 RANKL 这两种细胞因子存在的条件下经过 4~6 d 培养可以被诱导为破骨细胞。

关键词: RAW264.7 细胞;破骨细胞;NFATc1;TRAP;MMP-9

中图分类号: R68 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2021)03-0306-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.03.003

Research on methods of modeling osteoclast

Yang Yiqiu¹, Li Lan¹, Xie Jisheng²

- (1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 2. Department of Histoembryology, School of Basic Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the optimal conditions for RAW264.7 cells to differentiate into osteoclasts, so as to provide a reliable osteoclast modeling method for subsequent experimental research. **Methods**

RAW264.7 cells were inoculated into 6-well plates and 24-well plates, with 2×10^4 cells in each well and 3×10^3 cells in each well, respectively. After 24 hours of attachment, they were cultured with induction solution containing 20 ng/ml of macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and 50 ng/ml of receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B-ligand (RANKL). The fluid was changed every three days. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining was performed when many osteoclasts were observed under the microscope. We detected the mRNA expressions of nuclear factor of activated T-cells, cytoplasm 1 (NFATc1), TRAP and ma-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81560362)

第一作者简介:杨一秋(1991—),女,在读硕士研究生,研究方向:骨转换、骨代谢异常与骨质疏松, E-mail:15152865770@163.com

通讯作者简介:解继胜(1968—),男,硕士,教授,硕士研究生导师,研究方向:骨转换、骨代谢异常与骨质疏松, E-mail:xiejisheng1968@163.com

trix metalloproteinase-9 (MMP-9) by real-time quantitative PCR. **Results** After being induced and cultured for 3 days, osteoclasts began to aggregate and grow with appearance of multiple nuclei, but there were few whole positive osteoclasts. After 4~6 days of induction, we observed and found large-sized osteoclasts with dozens of nuclei and abundant cytoplasm. In comparison with the control group, the induction group had up-regulated mRNA expressions of NFATc1, TRAP and MMP-9. NFATc1 and MMP-9 levels in the induction group were statistically significant different from those in the control group ($P < 0.05$), but their TRAP level was not statistically significant different from those in the control group. **Conclusion** RAW264.7 cells can be induced into osteoclasts after 4~6 days of culture in the presence of 20 ng/ml of M-CSF and 50 ng/ml of RANKL.

Key words: RAW264.7 cells; osteoclasts; NFATc1; TRAP; MMP-9

骨质疏松症是一种以骨量减少,骨骼微结构退化、脆性增加的疾病。绝经期妇女由于卵巢功能减退、雌激素水平的下降加速了骨质的流失,增加了骨折的风险^[1]又称为绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)。发生 PMOP 时破骨细胞功能活跃,又被称为高转换型骨质疏松症^[2]。骨稳态取决于破骨细胞对骨骼的吸收和成骨细胞对骨骼的形成作用,这种紧密耦合过程的不平衡会导致骨质疏松症、关节炎等疾病^[3]。骨质疏松性骨折危害巨大,但是目前椎体成形术这种手术方式,因其创伤小,并发症低等优势对于治疗骨质疏松症致脆性骨折有一定疗效^[4]。因此,调节破骨细胞和成骨细胞之间的平衡对于骨细胞生物学至关重要^[5]。多项研究^[6-9]主要聚焦于各种药物、蛋白等对破骨细胞的影响以及其具体机制的探究,其中关于 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化的具体方法各有不同。因此,本实验的主要目的是为了探索 RAW264.7 细胞向破骨细胞分化的最佳条件,为后续的实验研究提供一个可靠的破骨细胞建模方法。

1 材料与方法

1.1 材料 DMEM 高糖培养基(Gibco,货号 C11995 580BT)、FBS 胎牛血清(Gibco,货号 10099141C)、青链霉素双抗(Gibco,货号 15140122)、胰蛋白酶-EDTA,0.25%,含酚红(Gibco,货号 25200-056)、巴氏吸管、Recombinant Mouse M-CSF Protein (RD,货号 416-ML-050/CF)、Recombinant Mouse TRANCE/RANKL(RD,货号 462-TEC-010/CF)、RAW264.7 细胞(购自中科院上海细胞库)、抗酒石酸酸性磷酸酶 TRAP 染色试剂盒(CTCC,货号 JD005)、RNA 提取试剂盒 (AXYGEN,货号 AP-MN-MS-RNA-50G AxyPrep 总 RNA 小量制备试剂盒)、实时荧光定量 PCR 试剂盒(Hieff TM qPCR SYBR Green Master Mix No Rox,货号 11201ES08)、倒置显微镜。

1.2 方法

1.2.1 破骨细胞诱导方法 从 -80° 冰箱取出 RAW264.7 细胞,立刻放到 37° 水浴锅中摇晃解冻。待冰晶融化后将细胞悬液吸至 15 ml 离心管中,以 1000 r 离心 5 min 后,弃掉上清,加入 1 ml 完全培养基,将细胞悬液转移至 25 cm^2 培养瓶中,放入 37° ,5% CO_2 培养箱中培养 24 h。待贴壁 24 h 后,用胰酶消化细胞按 2×10^4 个每孔、 3×10^3 个每孔分别接种到 6 孔板、24 孔板中,待细胞贴壁 24 h 后,对照组加入完全培养基,实验组加入诱导液(20 ng/ml 的 M-CSF、50 ng/ml 的 RANKL)诱导培养,每隔 2 d 换液 1 次。待成功诱导出破骨细胞后进行 TRAP 染色,并通过实时荧光定量 PCR 检测活化 T-细胞核因子 1(NFATc1)、TRAP、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)的 mRNA 表达水平。

1.2.2 TRAP 染色方法 CTCC TRAP 染色法:24 孔板中细胞培养到达指定天数后,弃掉培养基,加入 1 号洗涤液清洗,加入固定液室温固定 5 min,然后加入 2 号洗涤液,清洗 2 次。再加入 TRAP 染色液 37° 避光孵育 15 min。染色结束后,加入 2 号洗涤液清洗 2 次,于显微镜下观察并拍照。若破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶活性较低,可适当延长染色时间在显微镜下观察染色达到预期深浅。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 NFATc1、TRAP、(MMP-9)的 mRNA 相对表达量 6 孔板中细胞培养达到指定天数后,根据试剂说明书提取总 RNA,然后将 RNA 逆转录为 cDNA 并进一步扩增目的基因。逆转录条件: 42°C 孵育 60 min, 70°C 加热 5 min 扩增条件: 95°C 预变性 300 s; 95°C 变性 10 s; 60°C 退火/延伸 30 s,共 40 个循环,以上操作均在冰上进行。以 β -actin 为内参,目的基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 法。引物序列见表 1。

表 1 目标基因引物序列

基因	引物序列(5'→3')
NFATc1	上游:CATCCTTGCCTGCCTTGACTG
	下游:TGAGCCCTGTGGTGAGACTTGG
TRAP	上游:CAGTGCTGTGATTTGTGCCA
	下游:TTAACCCGAAGCCCTTGATT
MMP-9	上游:CACCGGCTAAACACCTC
	下游:CGCCCGACACACAGTAAG
β-actin	上游:CCTCACTGTCCACCTTCC
	下游:GGGTGTAACGACAGCTC

1.2.4 统计学方法 通过 SPSS 17.0 进行统计学分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用两独立样本 *t* 检验,当 $P < 0.05$ 时,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 破骨细胞未染色的形态学观察 RAW264.7 细胞在向破骨细胞分化过程中,随着诱导分化时间的不同会呈现出不同的形态。利用倒置相差显微镜观察 RAW264.7 细胞诱导前后,细胞形态变化情况。将 RAW264.7 细胞以 2×10^4 个每孔接种到 6 孔培养板中,经完全培养基正常培养贴壁 24 h 的 RAW264.7 细胞呈圆形,小而饱满,透光性好,边界清晰,结构完整,没有或少见触角,见图 1A;经诱导分化培养基培养 3 d 的 RAW264.7 细胞,细胞变长呈梭形,头尾伸出长长的触角,见图 1B;经诱导分化培养基培养 4 d 的 RAW264.7 细胞,开始相互融合形成多核细胞。单个细胞形态变得更为不规则,胞体变大,细胞四周长出多个触角,伪足增多,见图 1C;经诱导分化培养基培养 6 d 的 RAW264.7 细胞,细胞融合成多个核细胞,胞质增多,细胞体积进一步增多,可见较多的破骨细胞,见图 1D;如果进一步延长诱导时间如诱导 8~9 d,破骨细胞胞质破裂,细胞核溶解,背景变得模糊,细胞聚集成团呈现漂浮状,见图 1E、图 1F。

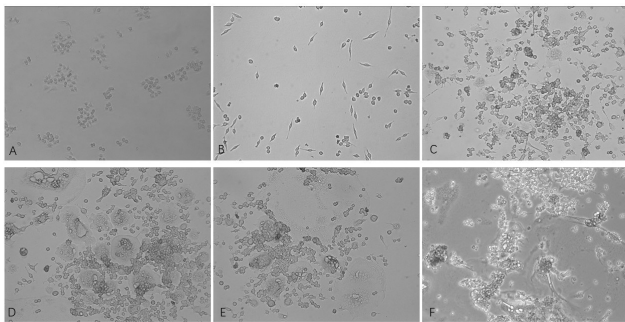
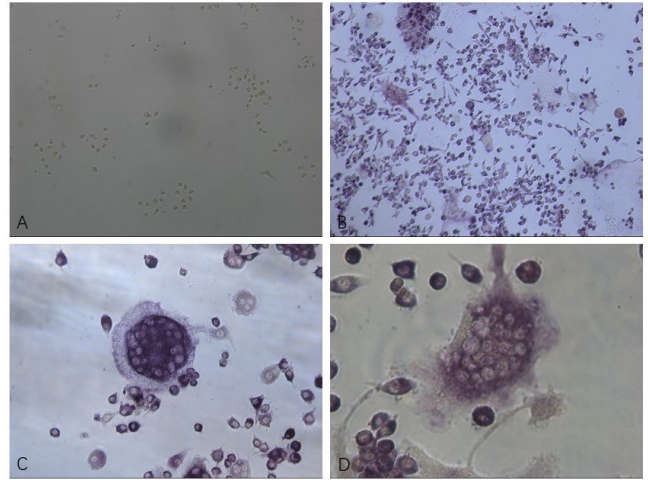


图 1 RAW264.7 不同诱导时间形态变化图(10×)

2.2 破骨细胞 TRAP 染色的形态学观察 将 RAW264.7 细胞以 3×10^3 个每孔接种到 24 孔板中,培养 4 d 后通过 TRAP 染色发现经完全培养基培养的 RAW264.7 细胞,不见破骨细胞,图中细胞未被

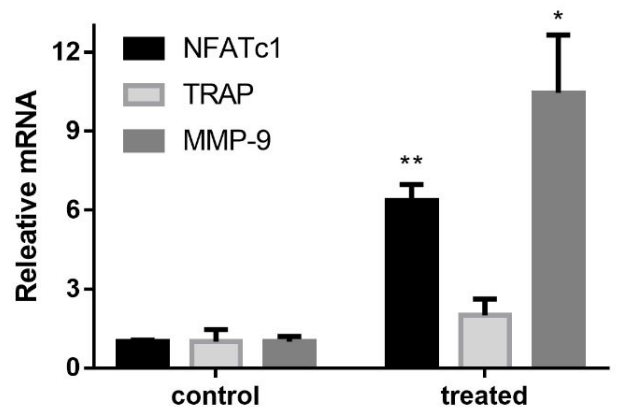
TRAP 着色,见图 2A。经诱导分化培养基培养 4 d 的 RAW264.7 细胞,经过 TRAP 染色可见破骨细胞被着色,阳性率较高,见图 2B、图 2C、图 2D。



注:A:10×;B:10×;C:20×;D:40×

图 2 破骨细胞 TRAP 染色图

2.3 实时荧光定量 PCR 检测 NFATc1、TRAP、MMP-9 的 mRNA 表达水平 6 孔板中 RAW264.7 细胞经过诱导 6 d 后通过实时荧光定量 PCR 检测,发现与对照组(完全培养基组)相比,NFATc1、TRAP、MMP-9 的 mRNA 水平均上调。NFATc1、MMP-9 与对照组的差异有统计学意义($P < 0.05$),但是 TRAP 与对照组的差异没有统计学意义($P > 0.05$)。结果见图 3。



注:与 control 组相比,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$; Releative mRNA 为以 control 组为参照的 mRNA 相对表达量。

图 3 对照组与诱导组 NFATc1、TRAP、MMP-9 的 mRNA 表达情况

3 讨论

发生 PMOP 时破骨细胞功能活跃,因此,熟练掌握建立破骨细胞诱导模型的方法对于后续探索用药机

制十分重要。RAW264.7 细胞是小鼠巨噬细胞系,可以被诱导为破骨细胞,是实验室常用的细胞系,相比于小鼠骨髓巨噬细胞 (bone marrow macrophage, BMM),RAW264.7 细胞具有在体外易于生长、经过诱导形成的破骨细胞较多、无需分离、纯化等优势。这与杨佛等^[10]的研究结果一致,即骨髓单核细胞和 RAW264.7 细胞在 50 ng/ml 的 M-CSF 和 100 ng/ml 的 RANKL 存在的条件下经过诱导培养 5 d 可以见到体积较大数量较多的破骨细胞,且 RAW264.7 细胞诱导形成的破骨细胞更多。另外,细胞的状态也会影响破骨细胞的形成,当细胞传代过多时,细胞形态变得不规则、触角增多,分化严重时不适合诱导。研究中发现 RAW264.7 细胞如果只加入 RANKL 而不加入 M-CSF 将会导致诱导时间延长,若 M-CSF 加入过多会使细胞生长过密,即使后面再加入 RANKL 也无法形成破骨细胞。Song CC 等^[11]研究发现合适的细胞种植密度以及适宜的 RANKL 干预时间点都会影响破骨细胞形成的数量,这与我们实验的观点相同。所以实验开始前就确定好种板密度,并同时加入 M-CSF 和 RANKL 约 4~6 d 就可以诱导出破骨细胞。但是由于诱导剂的批次以及细胞培养过程中计数的误差将会导致破骨细胞出现的天数可能推迟或提前,但总体上约 4~6 d 可以达到满意效果。

RANKL 和破骨细胞前体表面上 RANK 结合,通过一系列信号转导最终激活转录因子活化 T 细胞核因子(nuclear factor-activated T cell, NFATc1),激活后的 NFATc1 从细胞质进入细胞核转录出破骨细胞特异性基因如 TRAP、组织蛋白酶 K (cathepsin K, CTSK)、MMP-9 等^[12]。NFATc1 的表达对于破骨细胞的生成至关重要,即使在不存在 RANKL 的条件下,NFATc1 在破骨细胞前体细胞中的异位表达也可以促进破骨细胞的生成^[13]。本实验将 RAW264.7 细胞以每孔 2×10^4 个、每孔 3×10^3 个分别接种到 6 孔板、24 孔板中,待贴壁 24 h 后更换为含 M-CSF 和 RANKL 的诱导培养基,诱导约 4 d 后,可以看到 24 孔培养板中出现破骨细胞。诱导约 6 d 后,可以看到 6 孔板中出现破骨细胞。经过 TRAP 染色发现只有诱导后的破骨细胞才能着色而未加诱导剂的细胞则不被 TRAP 染色。并通过实时荧光定量 PCR 检测 NFATc1、TRAP、MMP-9 的 mRNA 均呈现上调趋势,进一步证明破骨细胞诱导成功。

但是,由于 RAW264.7 细胞贴壁严重、难以消化、

容易分化、诱导剂 M-CSF 和 RANKL 的价格昂贵、诱导成功的破骨细胞容易死亡等问题,在一定程度上也限制了破骨细胞研究的发展。

参考文献:

- [1] Lane JM, Russell L, Khan SN. Osteoporosis[J]. Clin Orthop Relat Res, 2000, (372): 139-150.
- [2] 朱建民,程秦娣. 绝经后骨质疏松[J]. 中华内分泌代谢杂志, 1996, 12(4): 43-47.
- [3] Novack DV, Teitelbaum SL. The osteoclast: friend or foe? [J]. Annu Rev Pathol, 2008, 3: 457-484.
- [4] 罗同青,谢湘涛,胡朝晖. 单侧椎弓根旁入路在中上胸椎骨质疏松性压缩骨折经皮椎体成形术中的临床研究[J]. 右江民族医学院学报, 2020, 42(4): 471-476.
- [5] Chen X, Wang ZQ, Duan N, et al. Osteoblast-osteoclast interactions[J]. Connect Tissue Res, 2018, 59(2): 99-107.
- [6] Kohara Y, Haraguchi R, Kitazawa R, et al. Knockdown of Lrp1 in RAW264 cells inhibits osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast interactions in vitro[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 523(4): 961-965.
- [7] Miyamoto T. The dendritic cell-specific transmembrane protein DC-STAMP is essential for osteoclast fusion and osteoclast bone-resorbing activity[J]. Mod Rheumatol, 2006, 16(6): 341-342.
- [8] Nakamura I, Jimi E. Regulation of osteoclast differentiation and function by interleukin-1[J]. Vitam Horm, 2006, 74: 357-370.
- [9] Sekiguchi Y, Mano H, Nakatani S, et al. Mangiferin positively regulates osteoblast differentiation and suppresses osteoclast differentiation[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2): 1328-1332.
- [10] 杨佛,杨文龙,李明慧,等. 骨髓单核细胞和 RAW264.7 细胞诱导培养破骨细胞的条件研究[J]. 江西中医药大学学报, 2020, 32(6): 95-99.
- [11] Song CC, Yang XB, Lei YS, et al. Evaluation of efficacy on RANKL induced osteoclast from RAW264.7 cells [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7): 11969-11975.
- [12] 李忠浩,丁宁,杨全增,等. 破骨细胞中 NFATc1 相关调节研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(5): 695-700.
- [13] Takayanagi H, Kim S, Koga T, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts[J]. Dev Cell, 2002, 3(6): 889-901.

收稿日期: 2021-01-29; 修回日期: 2021-03-02