

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.46.001 [http://www.crter.org]

朱伟平¹, 史伟², 林琳¹, 李中和¹, 黄瑾³ (中山大学附属第五医院, ¹肾内科, ³呼吸科, 广东省珠海市 519000; ²广东省人民医院肾内科, 广东省广州市 518900)

核因子κB受体活化因子配体诱导破骨细胞前体的培养与分化☆

朱伟平¹, 史伟², 林琳¹, 李中和¹, 黄瑾³ (中山大学附属第五医院, ¹肾内科, ³呼吸科, 广东省珠海市 519000; ²广东省人民医院肾内科, 广东省广州市 518900)

文章亮点:

1 文章采用不同浓度的分化刺激因子(细胞核因子 κB 受体活化因子配体)和不同的接种浓度诱导破骨细胞前体分化为成熟的破骨细胞, 同时检测其诱导全程的前体细胞凋亡情况, 探索最理想的破骨细胞培养方法, 全面论述了破骨细胞培养方法及关键技术细节, 在国内尚属首次。

2 实验结果显示, 骨髓细胞或 RAW264.7 细胞诱导破骨细胞的培养方法皆简单可行, 细胞接种的最佳浓度为 $10^4/\text{cm}^2$; 核因子 κB 受体活化因子配体的适宜刺激浓度为 30-50 μg/L。

关键词:

组织构建; 骨组织构建; 核因子 κB 受体活化因子配体; 破骨细胞; 细胞培养; 凋亡; 单核巨噬细胞; 矿物质和骨代谢紊乱; 肾性骨病; 骨髓细胞

主题词:

RANK 配体; 破骨细胞; 细胞凋亡; 单核巨噬细胞系统; 骨髓细胞

摘要

背景: 以往的研究多采用长骨机械分离法获得破骨细胞, 破骨细胞为终末分化细胞, 无法进一步增殖和传代。因此目前常用骨髓细胞诱导培养法和 RAW264.7 细胞诱导培养法获得大量的破骨细胞以满足实验需要。

目的: 探讨细胞核因子 κB 受体活化因子配体诱导破骨细胞前体细胞分化为成熟破骨细胞的最佳方法。

方法: 分离小鼠骨髓细胞后添加核因子 κB 受体活化因子配体与巨噬细胞集落刺激因子共同诱导或者取 RAW264.7 细胞单独加入核因子 κB 受体活化因子配体诱导破骨细胞的形成; 分别给予不同浓度的核因子 κB 受体活化因子配体, 观察生成破骨细胞的数量, 评价核因子 κB 受体活化因子配体与破骨细胞生成的量效关系; 采用膜联蛋白 V-FITC 联合 PI 染色进行流式细胞术分析破骨细胞形成过程中单核巨噬细胞的凋亡情况。

结果与结论: 当核因子 κB 受体活化因子配体浓度为 10 μg/L 时, 破骨细胞形成数量最多的时间点在第6至七天; 而核因子 κB 受体活化因子配体浓度为 100 μg/L 时, 高峰期出现在第四至五天。破骨细胞的形成数量随着核因子 κB 受体活化因子配体刺激浓度升高而增加, 呈浓度依赖性, 50 μg/L 的核因子 κB 受体活化因子配体是破骨细胞形成数量与浓度关系曲线的转折点, 高于 150 μg/L 以后破骨细胞形成数量的增幅明显放缓。核因子 κB 受体活化因子配体即能诱导单核巨噬细胞形成破骨细胞又可以促进其凋亡, 通过破骨细胞计数比较发现在同一浓度($10^4/\text{cm}^2$)接种单核巨噬细胞后以 30 μg/L 的核因子 κB 受体活化因子配体诱导后, 平均每单位核因子 κB 受体活化因子配体所获得的破骨细胞数量最多。提示骨髓细胞或 RAW264.7 细胞诱导破骨细胞的培养方法皆简单可行, 细胞接种的最佳浓度为 $10^4/\text{cm}^2$; 核因子 κB 受体活化因子配体的适宜刺激浓度为 30-50 μg/L。

Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand induces osteoclast precursor culture and differentiation

Zhu Wei-ping¹, Shi Wei², Lin Lin¹, Li Zhong-he¹, Huang Jin³ (¹Department of Nephrology, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China; ²Department of Nephrology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 518900, Guangdong Province, China; ³Department of Pneumology, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have applied long-bone mechanical separation method to obtain osteoclasts, which are terminally differentiated cells and cannot further proliferate. Therefore a large number of osteoclasts can be harvested with bone marrow cells inducing culture method and RAW264.7 cells inducing culture method to meet clinical requirements.

OBJECTIVE: To investigate the optimal method of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) induced osteoclast precursors to differentiate into mature osteoclasts.

METHODS: After bone marrow cells were isolated from mouse, RANKL and macrophage colony stimulating factor were added into the medium together, or RAW264.7 cells were cultured with RANKL to induce osteoclasts. The osteoclast precursors were treated with different concentrations of RANKL to observe the number of generated osteoclasts and evaluate the dose-effect relationship between RANKL and osteoclastogenesis.

朱伟平☆, 男, 1978年生, 广东省珠海市人, 汉族, 中山大学在读博士, 主治医师, 主要从事肾性骨病方面的研究。
358497720@qq.com

通讯作者: 黄瑾, 博士, 主任医师, 中山大学附属第五医院呼吸科, 广东省珠海市 519000
Huangjin1960@163.com

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344
(2013)46-07981-07

修回日期: 2013-09-03
(201307094/G·Y)

Zhu Wei-ping☆, Studying for doctorate, Attending physician, Department of Nephrology, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China
358497720@qq.com

Corresponding author: Huang Jin, M.D., Chief physician, Department of Pneumology, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China
Huangjin1960@163.com

Accepted: 2013-09-03

Annexin V-FITC and propidium iodide staining were used for flow cytometry to analyze the mononuclear-macrophage apoptosis during osteoclastogenesis.

RESULTS AND CONCLUSION: When 10 $\mu\text{g/L}$ RANKL was used, the peak of osteoclastogenesis appeared at days 6–7; when the concentration of RANKL was up to 100 $\mu\text{g/L}$, the peak appeared at days 4–5. The number of new osteoclasts was dose-dependent on the RANKL concentration. 50 $\mu\text{g/L}$ of RANKL was the turning point in the fitted curve from osteoclastogenesis and RANKL concentration. After the RANKL concentration was more than 150 $\mu\text{g/L}$, the number of osteoclasts slowed down obviously. RANKL can induce monocyte-macrophage to form osteoclasts and promote monocyte-macrophage apoptosis. The highest number of osteoclasts would be obtained to each unit of RANKL when monocyte-macrophage cells were cultured with 30 $\mu\text{g/L}$ of RANKL in the same vaccination density ($10^4/\text{cm}^2$). Experimental findings indicate that, RAW264.7 cells or bone marrow cells inducing culture methods are simple and feasible, the optimum cell seeding density was $10^4/\text{cm}^2$; the appropriate stimulation concentration of RANKL was 30–50 $\mu\text{g/L}$.

Subject headings: RANKL; osteoclasts; apoptosis; mononuclear phagocyte system; bone marrow cells

Zhu WP, Shi W, Lin L, Li ZH, Huang J. Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand induces osteoclast precursor culture and differentiation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(46):7981-7987.

0 引言 Introduction

人体的骨组织中含有成骨细胞和破骨细胞, 共同负责完成骨吸收和骨形成两个骨重塑过程, 两者处于动态平衡^[1]。破骨细胞是主要的骨吸收细胞, 来源于骨髓造血干细胞, 由骨髓中的多个单核巨噬细胞融合而成^[2]。破骨细胞数量和活性的增加与多种骨质流失的临床疾病密切相关, 包括骨质疏松、慢性肾脏病并发的矿物质和骨代谢紊乱^[3-4]; 破骨细胞还主导骨移植物的骨吸收作用和炎症性骨丢失等^[5-6]。这些疾病及其引发的骨折将严重影响患者的生活质量和生存时间^[7]。因此, 为了在矿物质和骨代谢紊乱的发病机制与治疗方面寻求突破, 破骨细胞成为相关研究的重点。随着时间的推移和科技的进步, 破骨细胞的培养方法也日新月异, 文章旨在探讨破骨细胞培养的相关技术, 以供广大的研究者参考。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 方法学实验。

时间及地点: 于2013年5月在广东省人民医院医学研究中心完成。

材料:

核因子 κ B受体活化因子配体诱导的细胞凋亡与破骨细胞培养方法实验的主要试剂:

试剂	来源
α -MEM 培养液	杭州吉诺公司
DMEM 培养液、青链霉素、胎牛血清	美国 Gibco
TRAP 染色试剂盒	南京建成
巨核细胞集落刺激因子、soluble murine 核因子 κ B受体活化因子配体	R&D 公司
小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7 细胞株	ATCC
Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒	上海碧云天公司

实验动物: 4周龄C57小鼠, 雌雄不拘, 由中山大学动物实验中心提供。

方法:

骨髓细胞培养: 按文献[8]方法拉颈处死4周龄C57小鼠, 用体积分数75%乙醇浸泡5 min; 无菌条件下分离一侧股骨, 清除骨表面的软组织和骨髓; 剪断两侧骨髓端, 用1 mL注射器吸取 α -MEM培养液缓慢地冲洗骨髓腔; 收集骨髓细胞混合液共10 mL, 加入巨噬细胞集落刺激因子至终浓度25 mg/L, 并接种至75 cm^2 培养瓶中, 置于37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数5% CO_2 培养箱内; 培养48 h后, PBS漂洗, 去除未黏附的淋巴细胞及血细胞, 以贴壁的骨髓单核细胞作为诱导破骨细胞的前体细胞。

RAW264.7 细胞培养: 按文献所述^[9], 将装有RAW264.7细胞的冻存管从液氮中取出, 迅速投入37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴, 800 r/min 离心5 min, 弃上清, 以 α -MEM重悬后进行接种, 隔天换液1次。待细胞铺满至70%即用细胞刮将贴壁的RAW264.7细胞刮下, 再次离心后取新鲜培养基重悬, 轻柔吹打均匀, 细胞按1:4传代。

诱导破骨细胞形成: 经细胞计数板计数, 将RAW264.7细胞和骨髓单核细胞按 $10^4/\text{cm}^2$ 的浓度接种于培养板。核因子 κ B受体活化因子配体以含0.1%牛血清白蛋白的PBS作溶媒进行溶解与分装, 储存于-20 $^{\circ}\text{C}$; 核因子 κ B受体活化因子配体用前取出解冻, 使用过程中始终置于冰块中, 用毕存放于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。RAW264.7细胞只加入核因子 κ B受体活化因子配体诱导其分化。骨髓单核细胞则需加入30 $\mu\text{g/L}$ 的核因子 κ B受体活化因子配体与25 $\mu\text{g/L}$ 的巨噬细胞集落刺激因子共同诱导。置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 培养箱内培养7 d, 隔天换液1次, 并保持核因子 κ B受体活化因子配体的终浓度为30 $\mu\text{g/L}$, 观察细胞形态特征变化。为寻找合适的细胞接种浓度与核因子 κ B受体活化因子配体浓度, 实验分别采用不同的接种浓度 ($5 \times 10^2/\text{cm}^2$, $7.5 \times 10^2/\text{cm}^2$, $1 \times 10^3/\text{cm}^2$, $3 \times 10^3/\text{cm}^2$, $5 \times 10^3/\text{cm}^2$, $7.5 \times 10^3/\text{cm}^2$, $1 \times 10^4/\text{cm}^2$, $3 \times 10^4/\text{cm}^2$, $7.5 \times 10^4/\text{cm}^2$, $1 \times 10^5/\text{cm}^2$, $3 \times 10^5/\text{cm}^2$),

$7.5 \times 10^5/\text{cm}^2$)和核因子κB受体活化因子配体浓度(10, 30, 50, 100, 150, 200, 250 μg/L)诱导破骨细胞生成。

TRAP染色实验: 培养于96孔板的RAW264.7细胞分5组, 每组设3个复孔。第1组不加核因子κB受体活化因子配体作为对照; 第2组加核因子κB受体活化因子配体刺激1 d; 第3组加核因子κB受体活化因子配体刺激3 d; 第4组加核因子κB受体活化因子配体刺激5 d; 第5组加核因子κB受体活化因子配体刺激7 d。于第8天取出培养板, PBS冲洗1次; 25 g/L的多聚甲醛固定10 min, PBS冲洗3次; 然后加入临时配制的TRAP染色液, 将培养板置入37 °C的恒温箱, 避光孵育1 h; 然后用苏木精复染3 min, PBS冲洗3次, 在倒置相差显微镜下观察及拍片。

破骨细胞凋亡检测: RAW264.7细胞在12孔培养板经核因子κB受体活化因子配体诱导生成破骨细胞, 分别于第2-6天每日采集细胞(约 1×10^5), PBS洗2次, 加入100 μL Binding Buffer和FITC标记的Annexin V (20 mg/L)10 μL, 室温避光30 min, 再加入PI (50 mg/L)5 μL, 避光反应5 min后, 加入400 μL Binding Buffer, 立即用流式细胞仪检测, 同时以不加染料的一管单核巨噬细胞作为阴性对照。活细胞不能被Annexin V-FITC或PI染色; 早期凋亡细胞因磷脂酰丝氨酸的暴露及具有完整细胞膜, 故呈Annexin V-FITC染色阳性及PI染色阴性; 坏死或晚期凋亡细胞呈Annexin V-FITC和PI染色双阳性。

破骨细胞计数: 将RAW264.7细胞按 $10^4/\text{cm}^2$ 的浓度接种于96孔板, 分别加入上述不同浓度的核因子κB受体活化因子配体培养, 每组浓度设3个复孔, 最后在倒置显微镜下对培养板的每个孔随机拍摄5个视野并计数。

主要观察指标: 破骨细胞形成数目、破骨细胞前体凋亡百分率。

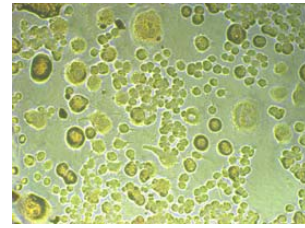
统计学分析: 由第一作者采用SPSS 13.0软件包进行统计学分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 破骨细胞的形成 两种方法获取破骨细胞的结果基本一致, 以下以RAW264.7细胞为例进行说明。

RAW264.7细胞刚贴壁时呈类圆形, 第2天可见伸出的伪足、单核, 极少数有2个核; 第3天可以观察到细胞开始发生融合, 逐渐形成空泡样多核巨噬细胞; 第5天细胞融合形成破骨样细胞达高峰; 第7天开始, 部分破骨细胞出现碎裂现象; 至第9天破骨细胞数目明显减少, 可见较多细胞碎片。

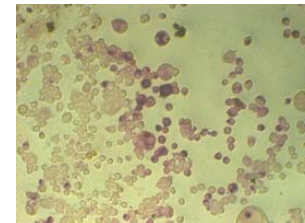
2.2 TRAP染色结果 见图1-4。



注: RAW264.7 细胞未经诱导时 TRAP 染色为阴性。

图1 未诱导时 RAW264.7 细胞的 TRAP 染色情况(倒置显微镜, ×100)

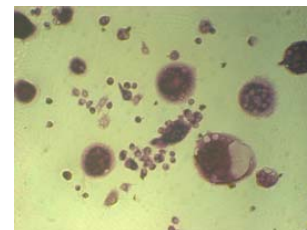
Figure 1 Non-induced RAW264.7 cells (Tartaric-resistant staining, inverted microscope, ×100)



注: RAW264.7 细胞经核因子 κB 受体活化因子配体诱导 1 d 后, 出现部分胞浆呈紫红色的 TRAP 阳性细胞。

图2 核因子 κB 受体活化因子配体诱导 1 d 后 RAW264.7 细胞的 TRAP 染色情况(倒置显微镜, ×100)

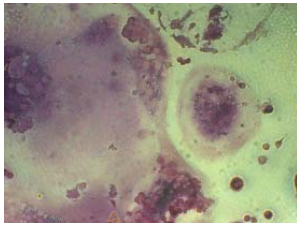
Figure 2 The RAW264.7 cells induced by RANKL for 1 d (Tartaric-resistant staining, inverted microscope, ×100)



注: 诱导 3 d 后, TRAP 阳性细胞进一步增多、融合, 体积增大, 并且可见囊泡。

图3 核因子 κB 受体活化因子配体诱导 3 d 后 RAW264.7 细胞的 TRAP 染色情况(倒置显微镜, ×100)

Figure 3 The RAW264.7 cells induced by RANKL for 3 d (Tartaric-resistant staining, inverted microscope, ×100)



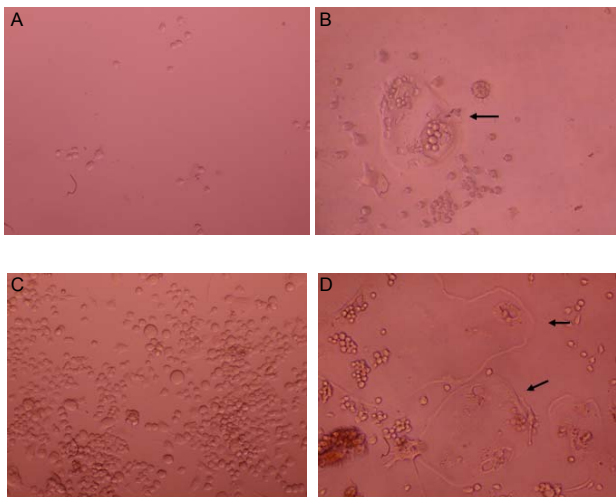
注: 诱导 5 d 后, 前体细胞已经分好为形态不规则、多核、胞浆丰富的成熟破骨细胞。

图 4 核因子 κB 受体活化因子配体诱导 5 d 后 RAW264.7 细胞的 TRAP 染色情况(倒置显微镜, ×100)

Figure 4 The RAW264.7 cells induced by receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand for 5 d (Tartaric-resistant staining, inverted microscope, ×100)

RAW264.7细胞诱导培养3 d后, 可见少量TRAP染色阳性的细胞, 类圆形, 体积明显比单核细胞大数倍; 培养5 d后, TRAP染色阳性的细胞形状不规则, 多核(核>3个), 体积大, 直径可达50–100 μm, 有伪足, 可见囊泡, 镜下细胞核呈紫蓝色, 胞浆中抗酒石酸酸性磷酸酶活性部位呈紫红色颗粒。

2.3 接种浓度与破骨细胞生成 见图5。



注: 按 $7.5 \times 10^2 / \text{cm}^2$ 接种单核巨噬细胞(A), 经 $30 \mu\text{g/L}$ 核因子 κB 受体活化因子配体诱导 5 d 后形成的破骨细胞数量非常少(B); 随着接种浓度的增加, 所获得的破骨细胞数量增多; 接种浓度达到 $3.0 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 时(C), 经 $30 \mu\text{g/L}$ 核因子 κB 受体活化因子配体诱导 5 d 后可收获大量的破骨细胞(D); 当接种浓度继续增加时, 所形成的破骨细胞反而减少甚至不能形成。箭头所示为破骨细胞。

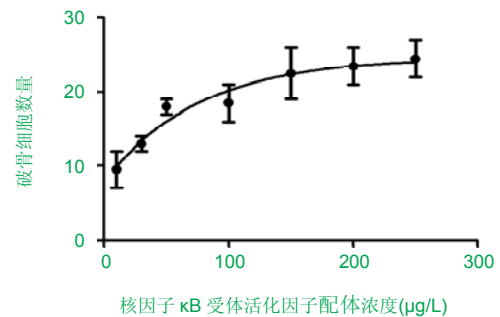
图 5 RAW264.7 细胞不同接种浓度对破骨细胞形成的影响(倒置显微镜, ×100)

Figure 5 The effect of RAW264.7 cell density on osteoclast formation (Inverted microscope, ×100)

RAW264.7细胞接种浓度低于 $10^3/\text{cm}^2$ 时, 虽然仍能有效诱导破骨细胞形成, 但数量稀少; 接种浓度高于 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 时, RAW264.7细胞经过增殖后逐渐凋亡, 未见破骨细胞的形成。

2.4 核因子κB受体活化因子配体刺激浓度与破骨细胞形成 RAW264.7细胞形成破骨细胞的数量随着核因子κB受体活化因子配体刺激浓度升高而增加, 呈浓度依赖性。当核因子κB受体活化因子配体浓度高于 $50 \mu\text{g/L}$ 后, 刺激RAW264.7细胞生成破骨细胞作用逐渐放缓。

从核因子κB受体活化因子配体浓度与破骨细胞形成的关系曲线可以反映出 $50 \mu\text{g/L}$ 是核因子κB受体活化因子配体与破骨细胞生成量效关系曲线的转折点, 见图6。



注: 随着核因子 κB 受体活化因子配体刺激浓度的增加, 在 96 孔板中的单核巨噬细胞分化为破骨细胞的数量逐渐增加, 其量效关系呈一上升曲线, 随着核因子 κB 受体活化因子配体浓度上升, 曲线的斜率逐渐降低并趋于平坦。

图 6 核因子 κB 受体活化因子配体浓度与破骨细胞形成的关系

Figure 6 The correlation between osteoclast formation and receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand concentration

核因子κB受体活化因子配体的诱导浓度高于 $150 \mu\text{g/L}$ 以后破骨细胞形成数量的增幅明显降低, 进入平台期。

2.5 流式细胞分析 见图7。

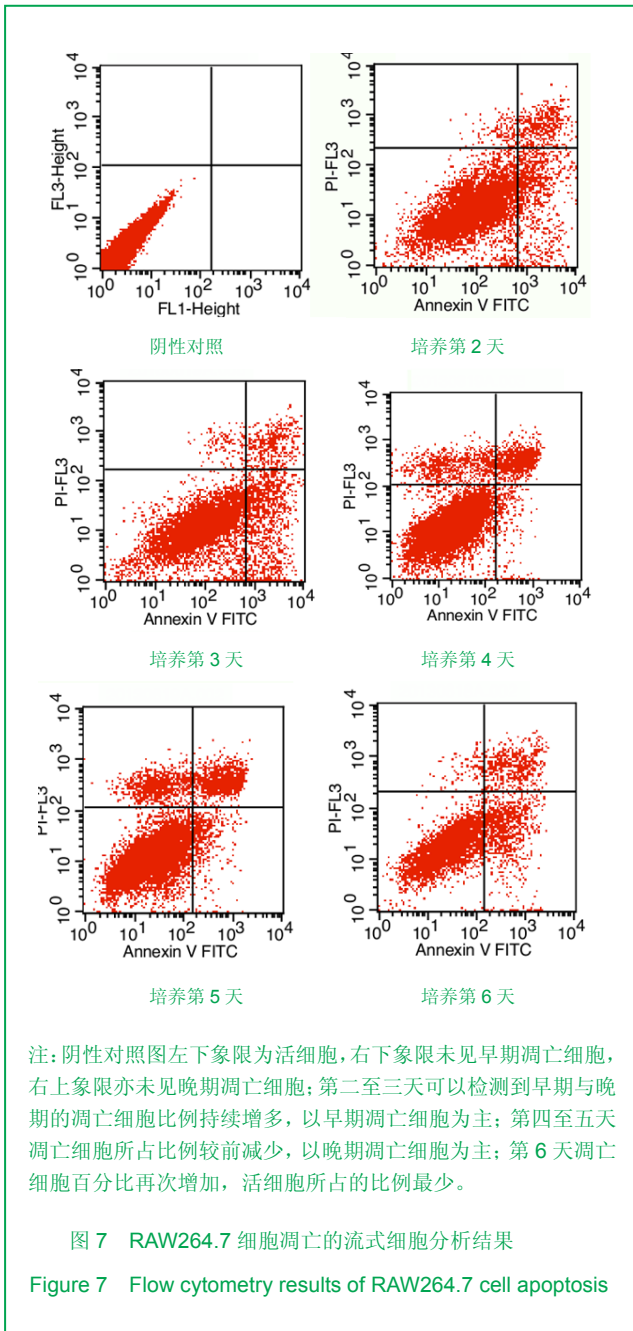
RAW264.7细胞给予 $30 \mu\text{g/L}$ 核因子κB受体活化因子配体诱导以后, 第2天可以看到部分早期凋亡细胞($11.0 \pm 1.2\%$), 晚期凋亡细胞较少($5.9 \pm 0.6\%$)。

第3天早期凋亡细胞比例增多($15.4 \pm 1.0\%$), 晚期凋亡细胞增加不明显($6.0 \pm 1.4\%$)。

第4天早期凋亡细胞比例较前减少($2.4 \pm 0.5\%$), 晚期凋亡细胞增多($10.3 \pm 2.1\%$)。

第5天仍有少量早期凋亡细胞($4.6 \pm 0.7\%$), 晚期凋亡细胞比例达到高峰($11.0 \pm 1.9\%$), 此时倒置显微镜下可见大量破骨细胞形成。

第6天活细胞比例降至最低($68.4 \pm 3.2\%$)。



3 讨论 Discussion

以往的研究多采用长骨机械分离法获得破骨细胞^[10], 该方法费时费力, 而且破骨细胞为终末分化细胞, 无法进一步增殖和传代。因此目前常用骨髓细胞诱导培养法、RAW264.7细胞诱导培养法、外周血单核细胞诱导培养法或脾干细胞诱导培养法获得大量的破骨细胞以满足实验需要, 以前2种方法应用最为广泛^[11-14]。

3.1 传代方法 单核巨噬细胞或RAW264.7细胞贴壁非常紧密, 即使用含0.2%EDTA的胰酶消化30 min并反复吹打也不容易使细胞脱壁, 并且消化时间过长会使细胞的活力下降, 导致后续培养的细胞生长状态不佳, 以

往也有类似报道^[15-16]。

因此, 采用细胞刮匙将细胞轻柔刮下, 充分吹打均匀后再按需要的浓度接种的效果更好。用细胞刮匙分离贴壁细胞所造成的损伤也比较轻微, 不影响后续的培养。传代比例以1:4-1:6为宜。

3.2 培养基 多数文献采用 α -MEM培养液作为破骨细胞前体或破骨细胞的培养基, 但也有部分研究者使用DMEM作培养基^[17-18]。后者的氨基酸和维生素的含量更为丰富, 并且还含有微量的铁离子。作者经过试验证实2种培养液均可应用, α -MEM培养液的营养成分对破骨细胞前体而言已经足够, 但分化成熟的破骨细胞在营养丰富的DMEM中生长得更好。换言之, 破骨细胞前体的增殖传代使用 α -MEM培养液, 而诱导破骨细胞分化时用DMEM培养液。

其次, 从液氮冰冻状态中复苏的单核巨噬细胞或RAW264.7细胞非常脆弱, 离心时不宜过快, 转速不应超过1 000 r/min; 重悬时吹打细胞悬液要轻柔。复苏后的细胞对培养基的温度也较为敏感, 重悬或换液前需将配备于50 mL离心管的培养基置入37 °C水浴箱至少15 min, 充分预热, 如整瓶配的培养基则需预热至少30 min。复苏的细胞加入未经充分预热的培养基将会影响细胞的生长与分化。

3.3 传代时间 状态良好的单核巨噬细胞增殖迅速, 一般接种至细胞长满培养瓶的60%-70%(两至三天)后即可进行传代, 不宜待细胞相互接触成簇或铺满培养瓶。若不及时传代, 细胞将叠层生长并逐渐老化甚至凋亡。

3.4 接种浓度 在诱导破骨细胞形成的过程中, 研究者对单核巨噬细胞接种浓度有不同的经验, 大多认为比较适宜的接种浓度为 10^3 - 10^5 /cm²^[19-22]。接种浓度太低, 缺乏足够的前体破骨细胞进行融合, 形成的破骨细胞数目少。接种浓度过高, 则细胞之间相互接触将抑制破骨细胞的生成。在本实验条件下以 7.5×10^3 - 3×10^4 /cm²浓度最为合适。

3.5 核因子 κ B受体活化因子配体刺激浓度和诱导时间 文献中所用的核因子 κ B受体活化因子配体浓度一般为10-125 μ g/L^[23-27]。核因子 κ B受体活化因子配体促进破骨细胞形成的作用呈浓度依赖性^[28-29], 其刺激浓度越高破骨细胞形成的高峰期就出现得越早。本实验数据显示, 当核因子 κ B受体活化因子配体浓度为10 μ g/L时, 破骨细胞生成数量最多的时间点第六至七天; 而核因子 κ B受体活化因子配体浓度为100 μ g/L时, 高峰期出现在第四至五天。核因子 κ B受体活化因子配体与细胞膜上的RANK结合后通过募集TRAF6和c-Src激活抗凋亡的PI3K/Akt信号, 促进破骨细胞存活^[30]。值得关注的是近年的研究发现核因子 κ B受体活化因子配体同时还具有抗增殖作用, 能促进单核巨噬细胞凋亡^[31], 可能是通过转化生长因子 β 激酶(TAK1)激活核转录因子 κ B实现

的^[32-33],但也有研究认为与核转录因子 κ B途径无关,而是与PI3K/mTOR、JNK/Bim(EL)等通路有关,可能经mTOR激活下游的P34cdc2激酶,上调P27kip,使细胞终止于G₀/G₁期或者通过JNK信号启动促凋亡基因Bim(EL)的表达^[34-37]。本实验还提示核因子 κ B受体活化因子配体促进单核巨噬细胞凋亡的作用与核因子 κ B受体活化因子配体刺激浓度呈正相关。膜联蛋白V-FITC联合PI染色进行的流式细胞分析结果与诱导单核巨噬细胞向破骨细胞分化过程中通过倒置显微镜所观察到大量细胞脱落的情况刚好互相吻合,即诱导的第二三天即可发现贴壁细胞脱落或漂浮,第四五天尤其显著,此时亦是破骨细胞形成的高峰期,随后脱落细胞又逐渐减少。由此可见,核因子 κ B受体活化因子配体具有诱导单核巨噬细胞形成破骨细胞又可以促进其凋亡的双重作用。通过破骨细胞计数比较,作者发现在同一浓度(10⁴/cm²)接种单核巨噬细胞继以30 μ g/L的核因子 κ B受体活化因子配体诱导后,平均消耗每单位(μ g)核因子 κ B受体活化因子配体所获得的破骨细胞数量最多。在诱导破骨细胞的过程中,当出现贴壁细胞脱落后,换液间隔时间应该适当缩短,以清除死亡的细胞,有利于形成更多破骨细胞。

总而言之,两种破骨细胞培养方法都操作相对简单并且行之有效,以RAW264.7细胞株诱导的方法更为简便、经济。此外,由于光镜观察破骨细胞对骨片的骨质吸收过程比较困难,图片成像不清晰;而扫描电镜又尚未普及,并且难以动态观察骨片的骨吸收情况,所以更多的研究者倾向于采用覆盖羟磷灰石结晶层的骨吸收活性测定板^[38-40],这种培养板可以通过倒置显微镜随时直接观察和评估破骨细胞的骨吸收功能。

致谢: 感谢广东省人民医院肾内科及刘双信教授。

作者贡献: 参与课题研究的作者贡献大小与排名顺序一致。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 核因子 κ B受体活化因子配体-为肿瘤坏死因子超家族的成员,由骨基质细胞和成骨细胞分泌。核因子 κ B受体活化因子配体是一种膜蛋白,能与细胞膜上的特异性受体RANK结合,影响细胞的分化与生长,核因子 κ B受体活化因子配体能诱导破骨细胞前体分化为成熟的破骨细胞。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, et al. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12(1):9-18.
- [2] Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(18): 7260-7264.
- [3] 刘波,于世凤,庞淑珍.新伐他汀体外对破骨细胞性骨吸收及大鼠骨代谢的影响[J].中国骨质疏松杂志,2005,11(3): 351-355.
- [4] 邱君思,陈靖.无动力型骨病发病机制的新进展[J].中国血液净化,2007,6(11):614-617.
- [5] 邢联平,张倩,姚振强.破骨细胞介导炎症性骨丢失的研究进展[J].中华创伤骨科杂志,2006,8(7):671-674.
- [6] 胡永成,王志强,孙世荃,等.同种异体骨移植后的病理组织学观察[J].中华骨科杂志,2004,24(10):597-603.
- [7] Nakashima T, Hayashi M, Takayanagi H. New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(11):582-590.
- [8] Hughes A, Kleine-Albers J, Helfrich MH, et al. A class III semaphorin (Sema3e) inhibits mouse osteoblast migration and decreases osteoclast formation in vitro. *Calcif Tissue Int.* 2012;90(2):151-162.
- [9] Zheng K, Chen DS, Wu YQ, et al. MicroRNA expression profile in RAW264.7 cells in response to *Brucella melitensis* infection. *Int J Biol Sci.* 2012;8(7):1013-1022.
- [10] 张庆鸿,梁星,刘梦桃.体外培养鼠破骨细胞对牙体硬组织的吸收实验[J].口腔医学,2007,27(9):452-454.
- [11] 朱振康,骆峪潇,李陶冶,等.破骨细胞体外培养的影响因素[J].浙江临床医学,2011,13(5):559-562.
- [12] 许多荣,余学清,方萼葵.甲状旁腺激素在体外对破骨细胞分化及骨重吸收能力的影响[J].中华肾脏病杂志,2005,21(4):186-190.
- [13] Takeshita S, Kaji K, Kudo A. Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 2000;15(8): 1477-1488.
- [14] Dempster DW, Hughes-Begos CE, Plavetic-Chee K, et al. Normal human osteoclasts formed from peripheral blood monocytes express PTH type 1 receptors and are stimulated by PTH in the absence of osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2005; 95(1):139-148.
- [15] 戴闽,程明,张斌,等. RAW264.7细胞在体外分化成破骨细胞的研究[J].天津医药,2010, 38(7):596-598.
- [16] 肖新华,周后德,王运林,等. RANKL诱导小鼠单核细胞 RAW264.7分化成成熟破骨细胞[J].中国骨质疏松杂志,2005, 11(2):151-155.
- [17] Rahman MM, Bhattacharya A, Fernandes G. Conjugated linoleic acid inhibits osteoclast differentiation of RAW264.7 cells by modulating RANKL signaling. *J Lipid Res.* 2006;47(8):1739-1748.
- [18] Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, et al. Isolation of human osteoclasts formed in vitro: hormonal effects on the bone-resorbing activity of human osteoclasts. *Calcif Tissue Int.* 2002;71(6):539-546.

- [19] Mochizuki A, Takami M, Miyamoto Y, et al. Cell adhesion signaling regulates RANK expression in osteoclast precursors. *PLoS One*. 2012;7(11):e48795.
- [20] Xu D, Shi Z, McDonald J, et al. Development of a chimaeric receptor approach to study signalling by tumour necrosis factor receptor family members. *Biochem J*. 2004;383(Pt 2): 219-225.
- [21] Liu Y, Song L, Wang Y, et al. Osteoclast differentiation and function in aquaglyceroporin AQP9-null mice. *Biol Cell*. 2009; 101(3):133-140.
- [22] 毛英杰,谷志远,赵鹏.不同细胞接种密度及饥饿对RAW264.7诱导分化的影响[J].*中国口腔种植学杂志*,2009,14(2):124-125.
- [23] Tomomura M, Hasegawa H, Suda N, et al. Serum calcium-decreasing factor, caldecrin, inhibits receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-mediated Ca²⁺ signaling and actin ring formation in mature osteoclasts via suppression of Src signaling pathway. *J Biol Chem*. 2012;287(22):17963-17974.
- [24] Ikeda F, Matsubara T, Tsurukai T, et al. JNK/c-Jun signaling mediates an anti-apoptotic effect of RANKL in osteoclasts. *J Bone Miner Res*. 2008;23(6):907-914.
- [25] Wu SH, Zhong ZM, Chen JT. Low-magnitude high-frequency vibration inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells. *Int J Med Sci*. 2012;9(9):801-807.
- [26] Hodge JM, Collier FM, Pavlos NJ, et al. M-CSF potently augments RANKL-induced resorption activation in mature human osteoclasts. *PLoS One*. 2011;6(6):e21462.
- [27] Makihira S, Mine Y, Kosaka E, et al. Titanium surface roughness accelerates RANKL-dependent differentiation in the osteoclast precursor cell line, RAW264.7. *Dent Mater J*. 2007;26(5):739-745.
- [28] 董伟,于静,戚孟春,等. M-CSF、RANKL浓度及M-CSF预诱导对破骨细胞生成影响的研究[J]. *生物医学工程学杂志*,2010, 27(6): 1336-1340.
- [29] 包洪卫,孙继芾,王青. 巨噬细胞集落刺激因子/核因子 κ B受体激活物配体体外诱导培养高纯度破骨细胞:最佳剂量探讨[J]. *中国组织工程研究与临床康复*,2010,14(2):191-195.
- [30] Raju R, Balakrishnan L, Nanjappa V, et al. A comprehensive manually curated reaction map of RANKL/RANK-signaling pathway. *Database (Oxford)*.2011;2011:r21.
- [31] 周怡,刘丽,张庆鸿. 鼠破骨细胞培养过程中凋亡现象的观察研究[J]. *口腔医学*,2010, 30(2):90-92.
- [32] Lamothe B, Lai Y, Xie M, et al. TAK1 is essential for osteoclast differentiation and is an important modulator of cell death by apoptosis and necroptosis. *Mol Cell Biol*. 2013;33(3):582-595.
- [33] Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(2): 263-268.
- [34] Bharti AC, Aggarwal BB. Ranking the role of RANK ligand in apoptosis. *Apoptosis*. 2004;9(6):677-690.
- [35] Sugatani T, Hruska KA. Akt1/Akt2 and mammalian target of rapamycin/Bim play critical roles in osteoclast differentiation and survival, respectively, whereas Akt is dispensable for cell survival in isolated osteoclast precursors. *J Biol Chem*. 2005; 280(5):3583-3589.
- [36] Glantschnig H, Fisher JE, Wesolowski G, et al. M-CSF, TNF α and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death Differ*. 2003; 10(10):1165-1177.
- [37] Sankar U, Patel K, Rosol TJ, et al. RANKL coordinates cell cycle withdrawal and differentiation in osteoclasts through the cyclin-dependent kinase inhibitors p27KIP1 and p21CIP1. *J Bone Miner Res*. 2004;19(8):1339-1348.
- [38] Lutter AH, Hempel U, Wolf-Brandstetter C, et al. A novel resorption assay for osteoclast functionality based on an osteoblast-derived native extracellular matrix. *J Cell Biochem*. 2010;109(5):1025-1032.
- [39] Okui T, Shimo T, Fukazawa T, et al. Antitumor effect of temsirolimus against oral squamous cell carcinoma associated with bone destruction. *Mol Cancer Ther*. 2010; 9(11):2960-2969.
- [40] Tang CH, Hsu TL, Lin WW, et al. Attenuation of bone mass and increase of osteoclast formation in decoy receptor 3 transgenic mice. *J Biol Chem*. 2007;282(4):2346-2354.